

博士（医学）論文

Doctor's Thesis

**新規ヒト cancer/testis 抗原 KM-HN-1 の
同定と免疫学的解析**

(Identification and immunological analyses of a novel human
cancer/testis antigen, KM-HN-1)

門司 幹男

Mikio Monji

指導教官

西村 泰治 教授

熊本大学大学院医学研究科免疫識別学

2004 年 3 月

目次

目次	1
1 要旨	3
2 発表論文リスト	5
3 謝辞	6
4 略語一覧	7
5 研究の背景と目的	8
5-1) HLA 分子による T 細胞への抗原提示	8
図 1 MHC クラス I による抗原ペプチドの CD8 ⁺ 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) への提示	11
図 2 MHC クラス II 分子を介した抗原ペプチドの CD4 ⁺ T 細胞への提示	12
5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし	13
図 3 抗原提示細胞抗腫瘍免疫応答の活性化	14
5-3) 腫瘍拒絶抗原の同定	15
5-4) SEREX 法の特徴	16
図 4 SEREX 法の概要	18
表 1 これまでに SEREX 法で同定された主な腫瘍抗原	19
5-5) Cancer-testis (CT) 抗原	20
5-6) 本研究の目的	20
6 実験方法	21
6-1) SEREX 法による腫瘍抗原遺伝子の単離	21
6-2) Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)	22
6-3) KM-HN-1 組み換え蛋白の作製	22
6-4) KM-HN-1 の細胞内局在の解析	23
6-5) KM-HN-1 の免疫組織化学的解析	23
6-6) 癌患者血清中の KM-HN-1 特異的抗体価の解析	23
6-7) 末梢血単核細胞(PBMC)からの KM-HN-1 特異的 CTL 株の樹立とスクリーニング	24
6-8) HLA-ペプチド結合試験	25
6-9) KM-HN-1 特異的 CTL 株の解析	25
図 5 腫瘍抗原ペプチド特異的な CTL 株の樹立法	27
表 2 腫瘍抗原遺伝子の RT-PCR に用いたプライマー	28
7 実験結果	30
7-1) 腫瘍抗原遺伝子の同定	30
表 3 頭頸部癌細胞株および正常精巢を用いた SEREX 法により同定された 19 種類の腫瘍抗原遺伝子	31
表 4 機能などが既知の 12 種類の腫瘍抗原遺伝子	32
表 5 機能などが不明の 7 種類の腫瘍抗原遺伝子	32
7-2) 腫瘍抗原遺伝子の発現解析	33

7-3)	KM-HN-1 のクローニング	33
表 6	13 種類の正常臓器と癌組織での腫瘍抗原 mRNA の発現	34
図 6	KM-HN-1 蛋白のアミノ酸配列	35
7-4)	KM-HN-1 の癌組織および癌細胞株での発現解析	36
7-5)	KM-HN-1 の細胞内局在の解析	36
7-6)	KM-HN-1 の免疫組織化学的解析	36
図 7	RT-PCR による正常臓器と癌組織での KM-HN-1 mRNA の発現解析	37
図 8	RT-PCR による癌細胞株での KM-HN-1 mRNA の発現解析	38
図 9	KM-HN-1 の細胞内局在の解析	39
図 10	正常精巢における KM-HN-1 の免疫組織化学的解析	40
図 11	癌組織における KM-HN-1 の免疫組織化学的解析	41
7-7)	癌患者血清中の KM-HN-1 特異的抗体価の解析	42
図 12	ELISA 法による各種癌患者および健常人血清中の特異的抗体価の解析	43
表 7	各種癌患者の癌組織における KM-HN-1 mRNA の発現と血清中の特異的抗体価の解析	44
7-8)	KM-HN-1 特異的 CTL 株の樹立	45
7-9)	KM-HN-1 特異的 CTL 株の癌細胞に対する細胞傷害活性の解析	45
表 8	健常人 PBMC から誘導した CTL 株の KM-HN-1 特異性と HLA-A24 拘束性	47
図 13	RMA-S-A*2402 細胞を用いた HLA-ペプチド結合試験	48
図 14	C1R-A*2402 細胞を標的とした細胞傷害活性	49
図 15	KM-HN-1 特異的 CTL 株による癌細胞株に対する細胞傷害活性	50
図 16	非標識標的細胞を用いた細胞傷害阻害試験	51
8	考察	52
9	おわりに	55
10	参考文献	56

1 要旨

近年、癌患者血清中の抗腫瘍抗体を用いた腫瘍組織由来の cDNA 発現ライブラリーのスクリーニングにより、腫瘍抗原を同定するという SEREX 法が開発され成果を納めている。現在までに様々な施設で SEREX 法による腫瘍抗原の同定が進められたが、その多くは腫瘍特異抗原ではなく免疫療法のターゲットとなりにくいものであった。本研究は現在理想的な腫瘍抗原と考えられている cancer/testis 抗原を正常精巣 cDNA 発現ライブラリーを使用した SEREX 法を用いて同定し、さらに抗腫瘍免疫応答を誘導するワクチンとしての臨床医学への応用の可能性を探ることを目的とする。

頭頸部扁平上皮癌細胞株及び正常精巣から樹立された 500 万個の cDNA クローンを含む 2 種類の ZAP cDNA 発現ライブラリーより、6 例の頭頸部扁平上皮癌患者血清中の IgG に反応する 28 個の陽性クローンを得た。各クローンの塩基配列を解析し、既知の遺伝子 12 種、および未知の遺伝子 7 種の合計 19 種類の遺伝子を同定した。

13 種類の正常組織および 13 種類の癌組織由来の mRNA を用いて、上記の遺伝子の発現を RT-PCR 解析により検討した。19 種類の遺伝子のうち正常組織では精巣のみにしか発現しないが、様々な癌組織で発現する cancer/testis 抗原と同様の発現パターンを示すものが 2 種類存在した。このうちのひとつは新規遺伝子であり KM-HN-1 と名付けた。RT-PCR 法を用いた解析で KM-HN-1 は舌癌、甲状腺癌、胃癌、肺癌、悪性黒色腫、肝細胞癌の癌組織に発現し、また癌細胞株では頭頸部癌、食道癌、大腸癌、肝細胞癌、胃癌、肺癌において発現していた。KM-HN-1 の組み換え蛋白を作製し、ウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製して癌組織での蛋白の発現を検討したところ、食道癌、大腸癌、乳癌、などでの発現が確認された。また ELISA 法を用いて血清中の KM-HN-1 に対する IgG 抗体価を調べたところ、健常人ではほとんど検出できなかったが、様々な癌患者では 40-100%の抗体陽性率を示し、癌患者では *in vivo* において KM-HN-1 に対する免疫応答が誘導されていることが明らかとなった。

KM-HN-1 の腫瘍拒絶抗原としての有用性を検討する目的で、日本人の約 6 割がもつ HLA-A24 による抗原提示を受ける抗原特異的な CTL が誘導できるか否かについて検討した。HLA-A24 結合モチーフをもつ KM-HN-1 由来の 9 もしくは 10mer のペプチドを 13 種類合成した。健常人の PBMC より分離した CD8 陽性 T 細胞を樹状細胞を用いて刺激したところ、2 種類のペプチドで KM-HN-1 特異的で癌細胞傷害活性をもつ CTL 株が樹立できた。

以上の結果は、本研究において SEREX 法で同定した新規 cancer/testis 抗原 KM-HN-1 が、腫瘍マーカー、さらには抗腫瘍免疫療法に利用できる可能性を示すものである。

Summary

Purpose: We used serological screening of a cDNA expression library of human testis to identify novel cancer/testis antigens that elicit humoral and cellular immune responses in cancer patients.

Experimental Design and Results: cDNA libraries from cell lines of squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN) and a normal testicle tissue were screened using sera from six allogeneic SCCHN patients. Total 28 positive clones belonging to 19 different genes were identified, including 12 known genes and 7 unknown ones. Expression analysis on 13 normal tissues and 13 cancer tissues using reverse transcription-PCR (RT-PCR) revealed 8 ubiquitously expressed genes, 9 of which were expressed preferentially in cancer tissues and two cancer/testis (CT) antigens. A novel gene designated as *KM-HN-1*, one of the CT antigens we identified, of which expression is testis-specific among normal tissues, and it contains coiled coil domains and a leucine zipper motif and encodes a putative protein of 833 amino acids. *KM-HN-1* showed wide and high percentage expression in various cancer tissues and cancer cell lines at both mRNA and protein levels. Immunofluorescence staining of an esophageal cancer cell line reveals that *KM-HN-1* protein is present exclusively in the nucleus. Recombinant *KM-HN-1* protein was produced, and used for ELISA to quantitate levels of IgG antibody specific to *KM-HN-1*. High-titer IgG antibodies specific to *KM-HN-1* were detected in many types and numbers of cancer patients. The cytotoxic T lymphocytes lines specific to *KM-HN-1*, generated from *HLA-A*2402*-positive healthy donors, killed *HLA-A24*-positive cancer cells expressing *KM-HN-1*, but not cell lines that did not express either *KM-HN-1* or *HLA-A24*.

Conclusion: This study showed anti-*KM-HN-1* IgG antibodies can be useful for cancer detection and *KM-HN-1* can be an ideal target for cancer immunotherapy.

2 発表論文リスト

1. Monji, M., Senju, S., Nakatsura, T., Yamada, K., Sawatsubashi, M., Inokuchi, A., and Nishimura, Y. Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem Biophys Res Commun*, 294: 734-741, 2002.
2. Monji, M., Nakatsura, T., Senju, S., Yoshitake, Y., Sawatsubashi, M., Inokuchi, A. and Nishimura, Y. Identification of a novel human cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune systems. Submitted.
3. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., Furukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun*, 306: 16-25, 2003.
4. 中面哲也, 門司幹男, 西村泰治「SEREX」, *Surgery Frontier*, メディカルレビュー社(東京), 9:244-247, 2002.
5. 千住覚, 門司幹男, 西村泰治「移植免疫」, *免疫学最新イラストレイテッド* (小安重夫 編集), pp217-239, 羊土社(東京), 2003年

3 謝辞

本研究を行なうにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学講座西村泰治教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導を頂いた千住覚助教授及び中面哲也助手に深く感謝いたします。また西村教授の元で研究する機会を与えて頂いた佐賀大学医学部耳鼻咽喉科学講座井之口昭教授に深く感謝いたします。臨床サンプルを供与頂いた熊本大学大学院医学薬学研究部顎口腔病態学講座篠原正徳教授、皮膚機能病学講座小野友道教授、影下登志郎助教授および佐賀大学医学部耳鼻咽喉科学講座澤津橋基広先生に深く感謝いたします。

4 略語一覽

cDNA; complementary DNA

CT; cancer-testis

CTL; cytotoxic T lymphocyte

DNA; deoxyribonucleic acid

ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay

GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HLA; human histocompatibility leukocyte antigens

IFN; interferon

Ig; immunoglobulin

IL; interleukin

MHC; major histocompatibility complex

PBMC ; peripheral blood mononuclear cell

PBS; phosphate-buffered saline

RT-PCR; reverse transcription-PCR

SEREX; serological analysis of recombinant cDNA expression libraries

TBS; tris-buffered saline

TCR; T cell receptor

TNF; tumor necrosis factor

5 研究の背景と目的

5 - 1) HLA 分子による T 細胞への抗原提示

主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC)によりコードされる MHC 分子は、細胞内で抗原が分解されてできたペプチドを分子の先端に結合して細胞表面に発現する。T 細胞は抗原を直接認識することはできず、細胞表面に発現する抗原ペプチドと MHC 分子を複合体として認識する。MHC 分子にはクラス I とクラス II の 2 種類があり、それぞれ細胞内での局在が異なる抗原に由来するペプチドを機能の異なる T 細胞に提示して活性化を促す (1)。ヒトの MHC は白血球の血液型として発見されたために、ヒト組織適合性白血球抗原 (human histocompatibility leukocyte antigen; HLA)系と呼ばれる。

型 T 細胞レセプター (TCR)を発現する T 細胞のうち、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、HLA クラス I 分子に結合する性質を持つ CD8 分子を発現する。HLA クラス I 分子は主に核や細胞質の蛋白質に由来するペプチドを結合して、すべての有核細胞と血小板の表面に発現する。CTL は TCR を介して自己の HLA クラス I 分子に結合した、ウイルスあるいは細菌などの非自己蛋白質に由来するペプチドを認識して感染細胞を破壊する。さらに、腫瘍細胞の表面に発現する HLA クラス I 分子に結合した自己あるいは非自己ペプチドを認識した CTL は腫瘍細胞を破壊する (2)。また HLA クラス I 分子は、特定のウイルスあるいは細菌に感染した細胞、あるいは腫瘍細胞を破壊する性質をもつ ナチュラルキラー (NK) 細胞のレセプター (killer-cell inhibitory receptor; KIR) に結合し、NK 細胞の細胞傷害活性を抑制する (図 1C) (3)。

HLA クラス I 分子に結合するペプチドは、細胞質蛋白質にユビキチンが複数結合した後に、プロテアソーム (proteasome) あるいは LMP (large multifunctional protease) と呼ばれる蛋白分解酵素の複合体によりエネルギー (ATP) 依存性に分解されてできたものである (4, 5)。最近、細胞質内で mRNA が翻訳されてきたばかりの蛋白質のうち 30%にも及ぶものが直ちにこの経路に入ることが示されている。さらにペプチドは、HSP70 などのシャペロンにより小胞体に運搬され、TAP (transporter associated with antigen processing) 分子により、エネルギー (ATP) 依存性に小胞体の内腔へと導かれ、そこで HLA クラス I 分子のペプチド収容溝に結合する (図 1) (6)。このペプチド収容溝には、A ~ F ポケットと呼ばれる 6 個のポケットが存在する。MHC クラス I 結合ペプチドは 9 個のアミノ酸 (N 末端側より position-1(P1) ~ P9 と呼ばれる。) により構成されていることが多く、ペプチドは溝の両端からはみ出すことなく納まっている (図 1A, B) (7-9)。MHC クラス I

分子で多型を示すアミノ酸残基の多くは、分子の先端にあるペプチドを収容する溝を構成する 1 および 2 ドメインに集中している。このような多型によりペプチド収容溝の形状が変化するため、MHC クラス I 分子に結合可能なペプチドの構造も MHC クラス I 分子ごとに異なっている。つまり結合する MHC クラス I 分子ごとに、ペプチドの N あるいは C 末端寄りのアミノ酸には一定の傾向 (MHC クラス I 結合モチーフ) が認められる (10)。これらのアミノ酸の側鎖はペプチド収容溝の左端あるいは右端に位置する、それぞれ A (P1)、B (P2) あるいは F (P9) ポケットに収容される (図 1B) (6, 11)。これらのポケットとカッコ内に示した抗原ペプチド上の特定の位置に存在するアンカーアミノ酸の側鎖の大きさ、極性 (親水性あるいは疎水性) および荷電などの性質が適合した場合に、ペプチドは MHC クラス I に結合する。MHC クラス I 結合性ペプチドは中央部で折れ曲がりペプチド収容溝からせり上がっており、この部分のアミノ酸の側鎖が TCR により認識される。この状況は特にアミノ酸の数が 10 個以上のペプチドで顕著である。

一方、HLA クラス II 分子に結合する性質を持つ CD4 分子を発現する T 細胞は、主に樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、単球、B 細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) に限定して発現する HLA クラス II 分子に結合した非自己抗原ペプチドを認識して種々のサイトカインを分泌する。サイトカインは B 細胞に増殖と形質細胞への分化を誘導して抗体産生を促進したり、T 細胞の分化と増殖および抗原提示細胞の活性化を促したりして、細胞内の微生物の排除を促進する。抗原提示細胞は HLA クラス I 結合性ペプチドの提示のみならず、HLA クラス II 分子により提示される抗原のプロセッシングと提示という重要な機能を担っている。

図 2C に示すように、抗原提示細胞は細胞外から抗原を取り込み、これをエンドソーム内の種々の酵素により還元および分解してペプチドを作る。さらにペプチドは MHC (MHC class II compartments) や CIIV (class II vesicles) と呼ばれる別の細胞内コンパートメントで、HLA クラス II 分子に結合して細胞表面に発現する。MHC クラス II 分子のペプチド収容溝には、MHC クラス I 結合ペプチドと比較して長い 10~30 数個 (多くは 15 個前後) のアミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している (12, 13)。MHC クラス I ではペプチドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、MHC クラス II では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している。ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、MHC クラス I と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、1 アミノ酸残基進むごとに側鎖の方向が回転するため、ペプチド上で MHC クラス II に向かう複数の (通常 4~5 個) アミノ酸残基の側鎖がアンカーとなる。これらが MHC クラス II 上のペプチド収容溝に存在する 4~5 個のポケットに、うまく収容される形をしたアミノ酸の組み合わせ (MHC クラス II 結合モチーフ) になっている場合に、ペプチドは MHC クラス II に結合する (13)。ペプチド上の最も N 末端側のアン

カー残基の位置を position 1 (P1) として C 末端方向に各アミノ酸残基に番号を付けると、通常 P1, P4, P6 (P7) および P9 の各アミノ酸残基の側鎖が MHC クラス II 分子の溝に向かいアンカー残基となっていることが多い(図 2A, B)。さらに、これらのアンカー残基の間に介在している残基の側鎖が TCR により認識される。

HLA 分子は、たとえ非自己抗原が存在しても、その大多数は正常な自己蛋白に由来するペプチドを結合して細胞表面に発現しており、これを認識する T 細胞は胸腺における T 細胞の分化過程で消滅(クローン欠失)しているか、末梢で不活性化されアナジーの状態になるなどして免疫寛容(トレランス)の状態にあり、応答を示すことはない。

図 1

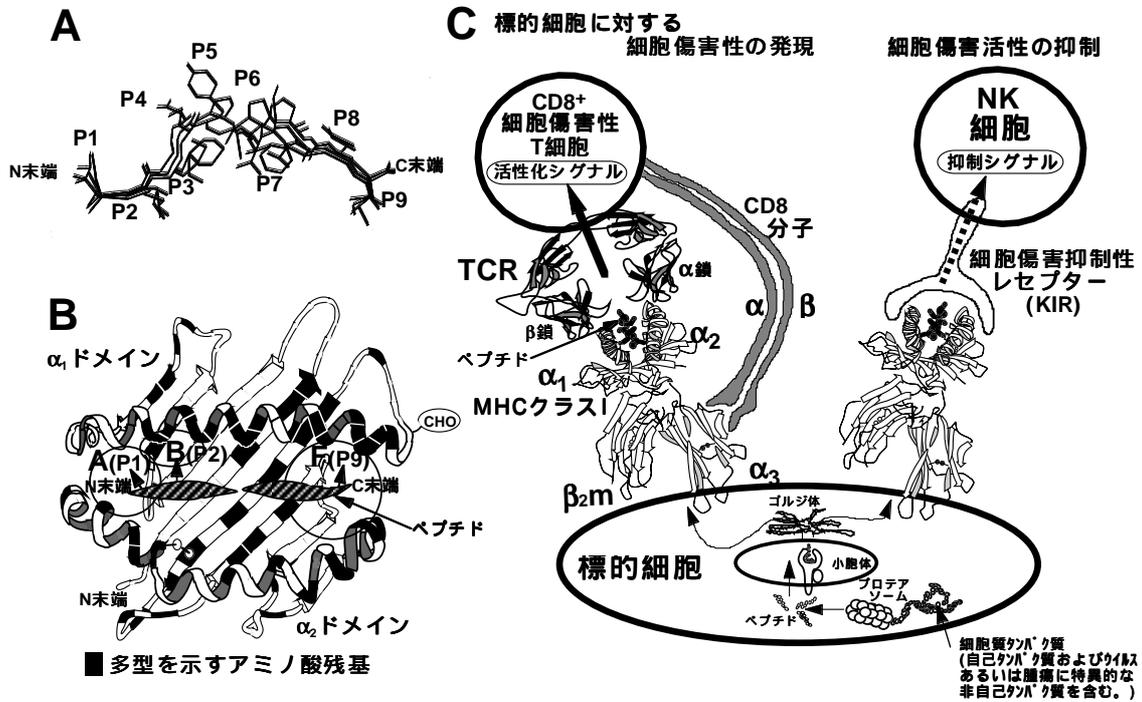


図 1. MHC クラス I による抗原ペプチドの CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞(CTL) への提示

A. MHC クラス I (ヒトの HLA-A2 分子) に結合性を示す、ウイルス由来の 5 種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドは P1-P9 で示した 9 個のアミノ酸からなり、両端 (N および C 末端) のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖が MHC クラス I のペプチド収容溝にある 3 つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基(P3-P7)の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がり TCR により認識される。B. MHC クラス I (HLA-A2 分子) のペプチド収容溝を、TCR 側より見た図。溝は相対する 2 つの ヘリックス(右巻きらせん)構造に囲まれている。丸は A, B および F ポケットの位置を示し、() 内の数字に対応するペプチド上のアンカーアミノ酸残基の側鎖がここに収容される。黒塗りの部分は MHC クラス I (ヒトの HLA クラス I) で多型を示すアミノ酸残基を示す。CHO は糖鎖を示す。C. MHC クラス I により提示された抗原ペプチドの認識による CTL の活性化および NK 細胞の細胞傷害活性の抑制。 α_1 , α_2 , α_3 および β_2m は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよび β_2 ミクログロブリンを表し、KIR は細胞傷害抑制性レセプター(killer-cell inhibitory receptor)を表す。

図 2

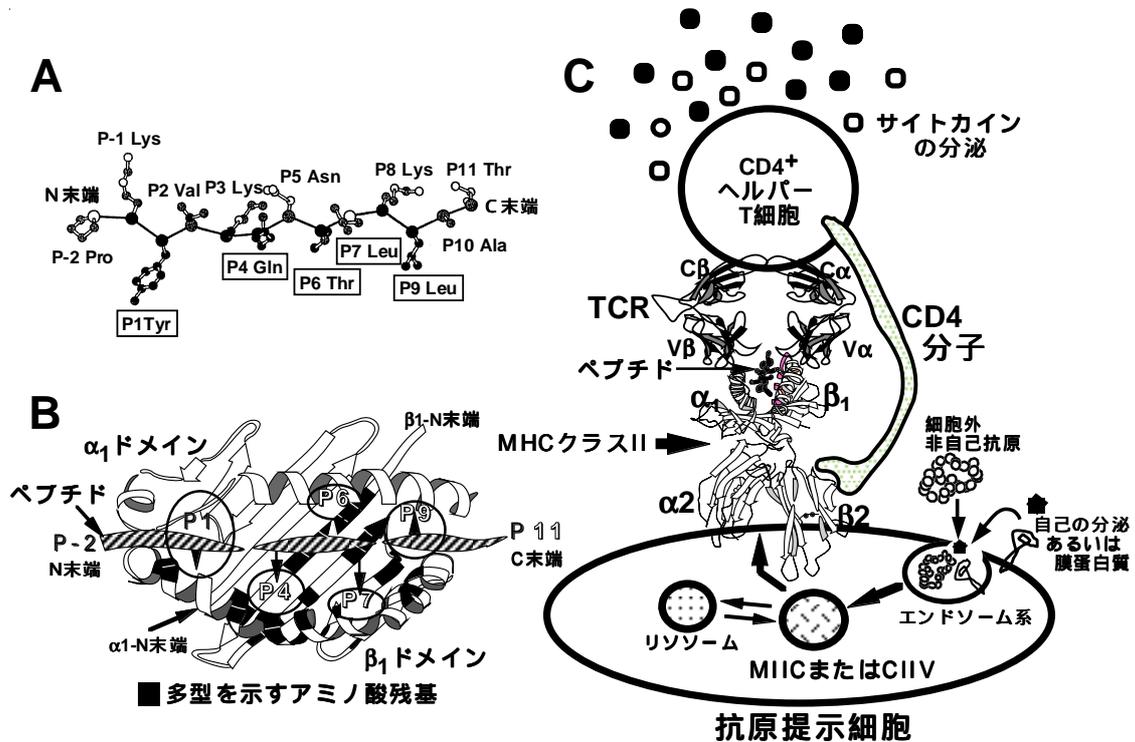


図 2 MHC クラス II 分子を介した抗原ペプチドの CD4⁺ T 細胞への提示

A. MHC クラス II 分子 (HLA-DR1)により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド (HA306-318)の構造を示す。MHC クラス II 分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最もN末端側の Tyr の位置を position 1 (P1)としてC末端方向に番号を付けた場合の、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。またアミノ酸の側鎖が、MHC クラス II 分子 のペプチド収容溝の5個のポケットに収容されるアミノ酸残基を四角で囲んで示した。ペプチド結合で結ばれたペプチドの主鎖を黒の実線で示す。各アミノ酸上の黒く塗りつぶした原子は MHC クラス II 分子に接している原子を、白い原子は MHC クラス II 分子とは接触していない原子を示す。B. HA306-318 を結合した MHC クラス II 分子を真上 (TCR側)より見た立体構造を示す。円は、HA306-318 ペプチド上で MHC クラス II 分子との結合に重要な5個のアンカーアミノ酸残基 (P1, P4, P6, P7 および P9) の側鎖を収容すべく、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝に存在するポケットの位置を示す。黒塗りの部分は、ヒトの代表的な MHC クラス II である HLA-DR 分子において多型性を示すアミノ酸残基を示す。C. 細胞外から抗原提示細胞に取り込まれた抗原がペプチドへと分解され、MHC クラス II 分子と結合して CD4⁺ T 細胞に提示される様子を示す。1, 2, 1 および 2 は、MHC クラス II 分子の細胞外ドメインを示す。TCR 部分の , は TCR の鎖と鎖を、また C と V は定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

5 - 2) 抗腫瘍免疫のあらまし

「悪性腫瘍に対して免疫系の応答は有効か」という疑問に対する、現時点での答えは以下のとおりであろう。腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)中に腫瘍に反応性のT細胞が多いこと、癌患者の末梢血に腫瘍抗原に対する免疫応答が検出されることなどから、免疫系は腫瘍と戦ってはいるが、腫瘍を排除するには至っていない。

従来の免疫強化療法は、非特異的に活性化された免疫応答のなかに抗腫瘍効果を期待したものであった。これに対し近年は、腫瘍に特異的な免疫応答をいかに増強するかが研究の焦点となっている。この分野では 1) HLA により提示される腫瘍拒絶抗原ならびにペプチドの同定、および 2) これを認識するT細胞の活性化方法の開発、が重要な問題となっている。近年の基礎免疫学の進歩により多くの腫瘍拒絶抗原が発見され、T細胞活性化のメカニズムも次第に明らかとなり、腫瘍免疫学は新しい局面を迎えつつある。

前述したように腫瘍拒絶抗原が細胞内でペプチドへと分解され HLA クラス I 分子により腫瘍細胞の表面に発現されると、主に CTL がこれを認識し腫瘍細胞を傷害する。ただし多くの腫瘍細胞は抗原を一度も認識したことの無いナイーブT細胞の活性化に不可欠な CD80(B7-1)/CD86(B7-2)などの共刺激分子を発現しておらず、直接 CTL を活性化することは出来ない。図 3 に示したように CD80/86 分子を発現する抗原提示細胞は腫瘍抗原を貪食し、腫瘍拒絶抗原ペプチドを HLA 分子に結合して、ナイーブ CD4 陽性ヘルパーT細胞および CD8 陽性 CTL に提示できる。ナイーブT細胞が活性化されてエフェクターT細胞になると、腫瘍細胞のように共刺激分子を発現していなくても T細胞レセプター(TCR)が認識可能な HLA・ペプチド複合体を発現していれば、T細胞はこれを認識して免疫応答を示す(14)。この際に CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパーT細胞は IL-2, IFN- γ , TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T細胞、B細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する(図 3)。活性化されたB細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

図 3

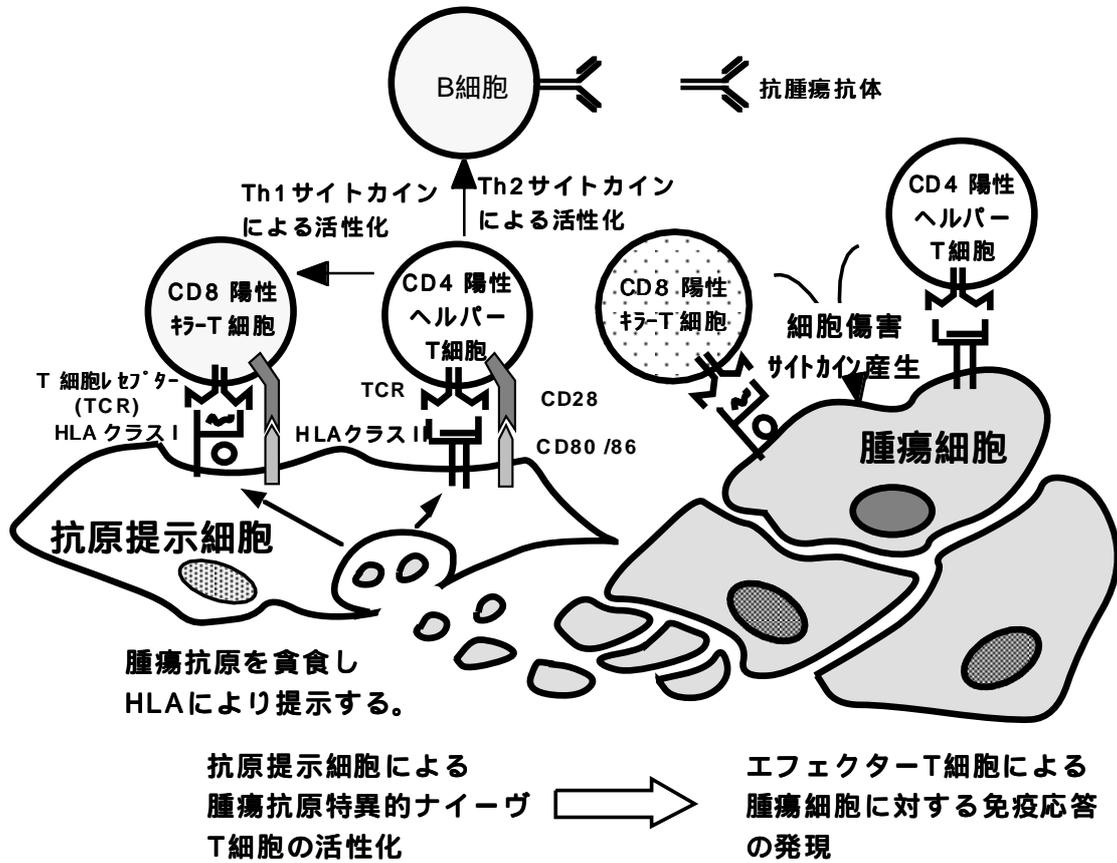


図 3 抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

腫瘍細胞それ自体は、ナイーブ T 細胞の活性化に不可欠な CD80/86 などの分子を発現していないことが多い。腫瘍抗原を貪食した抗原提示細胞は、これらをペプチドに分解し、HLA クラス I あるいは HLA クラス II 分子と結合した形で細胞表面に提示する。この HLA とペプチドの複合体を CD8 陽性ナイーブキラー T 細胞あるいは CD4 陽性ナイーブヘルパー T 細胞が T 細胞レセプターを介して認識するとともに、T 細胞上の CD28 分子が抗原提示細胞上の CD80/86 分子と結合して活性化される。一旦活性化されたエフェクター T 細胞は CD80/86 を発現していない腫瘍細胞に対しても免疫応答を示すことができる。CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞は IL-2、IFN- γ 、TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T 細胞、B 細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する。活性化された B 細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

5 - 3) 腫瘍拒絶抗原の同定

科学的基盤に立った癌の免疫療法を確立するための第一のステップは、ターゲットとなる腫瘍抗原を同定することである。このために、20世紀初めよりヒトや実験動物に発生した種々の癌を用いて多大な努力がなされてきた。しかし、腫瘍抗原の存在をヒトの癌で実証することはむずかしく、長いあいだその存在すら疑われていた。地道な研究が実を結び、ヒトの腫瘍抗原が分子レベルで明らかにされたのは、1991年であった。Ludwig 癌研究所 (Brussels Branch) の Boon らのグループ (15) は、メラノーマ患者の細胞傷害性 T 細胞が認識する腫瘍抗原、MAGE の遺伝子クローニングに成功した。彼らの論文が、ヒトの腫瘍抗原に科学的根拠を与え、また腫瘍抗原の同定方法も確立させた最初の報告であった。インターロイキン(IL)-2 使用による CTL のクローニングと長期培養と遺伝子の発現クローニング法という二つのよく確立された技術を組み合わせたことと、T 細胞による抗原認識の分子機構の解明という学問的進展がこれを可能ならしめた。CTL は抗原丸ごとを認識するのではなく、抗原蛋白質由来の 8~12 個のアミノ酸から成るペプチドと主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラス I 分子とが結合した複合体を認識する (2)。MHC 分子の役割は、ペプチド (抗原) を T 細胞に提示することである。したがって、抗原蛋白質そのものが細胞表面に存在する必要はなく、核や細胞質に存在する分子も適切にペプチドに分解され MHC 分子に結合すれば、細胞表面に移動し T 細胞に認識される。この画期的な発見は、それまで主に抗体を用いて検出することにより細胞表面分子に限定して考えられていた腫瘍抗原の概念を大きく変え、腫瘍抗原となりうる分子の種類と数を飛躍的に拡大させた。

Boon の発表後、癌患者由来の CTL が認識するメラノーマやほかの癌の腫瘍抗原が、分子生物学的な方法、もしくは生化学的方法を用いて同定されている (16-20)。最近、抗腫瘍免疫における CD4⁺ヘルパー T 細胞の重要性が指摘され、これが認識する腫瘍抗原も分子生物学的な方法や生化学的方法を用いて同定されるようになってきた (21, 22)。同定された抗原をターゲットにした癌の免疫療法の臨床試験が、欧米でもわが国でもすでに開始されている (23-26)。しかし、以下に述べるように、T 細胞の活性化を指標にした癌抗原の遺伝子発現クローニングによる同定には技術的な制約が多く、これまで同定された腫瘍抗原はメラノーマに関連するものが主であり、他の種々の癌における腫瘍抗原の同定にまでは普及しなかった。

抗体を用いた腫瘍抗原同定の試みは、CTL による試みより長い歴史をもつ。特に腫瘍特異的モノクローナル抗体は大きな期待をもって迎えられた。しかし、作製された抗体の多くは分化抗原に対するもので、“癌特異的”な抗原は同定されず、しかも癌免疫療法での抗体の有用性は特定の抗原を発現する癌に限定されたものとなっている。しかし、1995年にドイツ・Saarland 大学の Pfreundschuh ら (27)により、癌患者が自己の癌に反応して産生する抗体が

認識する腫瘍抗原を遺伝子の発現クローニングの手法を取り入れて同定する方法、SEREX(serological identification of antigens by recombinant expression cloning)が確立された。SEREX 法は、腫瘍抗原の同定を加速的に進展させており、すでに SEREX 法により同定された多数の腫瘍抗原がデータベース化されている(<http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB>)。さらにその一部をターゲットにして抗腫瘍免疫療法の臨床試験も開始されている。

5 - 4) SEREX 法の特徴

癌患者の血清中の抗体と同一患者由来の癌細胞との反応を検索し、腫瘍抗原を同定しようという試みが Old ら (28)によって、1970 年代半ばより開始された。またそれ以前にも、わが国の吉田孝人ら (29)により、癌患者が産生する抗体の癌細胞に対する反応性の検索がおこなわれている。このようないわゆる「Autologous Typing 法」により、糖鎖抗原などの重要な腫瘍抗原が同定された。しかし、当初は細胞表面に発現する腫瘍抗原に検索をかぎっていたため、また当時はまだ各種の分子生物学的方法も確立されておらず、得られた成果は限られたものであった。Autologous Typing 法に遺伝子発現クローニングを取り入れて開発されたのが SEREX 法である。方法の概略を図 4 に示した。腫瘍抗原同定における SEREX 法の最大の利点は、その簡便性にある。つまり SEREX 法では、癌細胞の培養株の樹立を必要とせず、T 細胞培養株の樹立も必要としないため、あらゆる癌での腫瘍抗原の検索に応用が可能である。さらに、癌患者の血清中の抗腫瘍抗体を利用するため、あらかじめ *in vivo* において抗腫瘍免疫を誘導することがわかった抗原を同定できるという特色がある。また、抗原の同定と遺伝子の同定が直結しており抗原の一次構造を直ちに決定できることも利点のひとつである。したがって、抗原の種々の正常あるいは癌組織における発現を調べることも容易である。

CTL もしくはヘルパーT 細胞、いずれの T 細胞による腫瘍抗原ペプチドの認識にも MHC 拘束性の制約があり、T 細胞が癌細胞を認識するためには T 細胞とターゲット腫瘍細胞との間に HLA 対立遺伝子が共有されている必要がある。さらに癌患者の癌に対する免疫応答を正確に解析するためにも、アロ反応が生じない Autologous の細胞培養系で検討する必要がある、T 細胞と癌細胞を同じ患者から培養株化することが不可欠である。しかし、癌細胞を試験管内で培養することは容易ではない。患者から摘出した癌組織から一定以上の確率で培養株を樹立できるのは、メラノーマ、腎癌、脳腫瘍、血液細胞腫瘍などに限られる。CTL による腫瘍抗原同定の研究がメラノーマで先行したのは、培養株の樹立が容易であったからである。その点、SEREX 法は患者血清と摘出した癌組織あるいはすでに樹立されたアロ腫瘍細胞株があれば、腫瘍細胞株の

樹立を一切必要とせず、あらゆる腫瘍で腫瘍抗原の同定に利用可能である。

腫瘍特異的 T 細胞株の樹立と解析には、高度な技術が必要である。さらに、T 細胞株を樹立しても、その抗原をコードする遺伝子を同定するためには、T 細胞応答を指標とした標的細胞由来 cDNA の発現クローニングや T 細胞が認識する HLA 結合性抗原ペプチドの単離および同定などの実験をおこなう必要がある。一方、SEREX 法で同定された抗原は、これをコードする遺伝子がすでに cDNA としてファージにクローン化されており、その塩基配列を決定するだけで一次構造の決定が可能である。

SEREX 法では患者血清を数十～数百倍に希釈し、また検出のために二次抗体として抗ヒト免疫グロブリン G (IgG) 抗体を用いる。このことにより、低力価の IgM クラス抗体の産生を誘導するような「自己抗原」を検索から除外し、高力価の IgG クラス抗体の産生を誘導する抗原に検索を限定することができる。IgG クラス抗体の産生にはヘルパー T 細胞の関与が必要であり、したがって同定された癌抗原は *in vivo* で少なくともヘルパー T 細胞には認識されることが保証されている。

一般的に、CTL のほうが抗体よりも強い抗腫瘍活性をもつと信じられている。SEREX 法の欠点は、同定された抗原が CTL のターゲットとなる保証がないことである。癌抗原を認識するヘルパー T 細胞が共存するほうが CTL はより効率よく誘導されるが、ヘルパー T 細胞の存在は CTL の存在を保証するものではない。しかし、現実には CTL で同定された腫瘍抗原を SEREX 法でも検出できること、また逆に SEREX 法で同定された腫瘍抗原が抗体産生と CTL を同時に誘導することも、すでに報告されている (30, 31)。

メラノーマを対象におこなった SEREX 法による腫瘍抗原の最初の検索で、新しい抗原に加えて CTL クローンを使った発現クローニング法で同定された MAGE-1 や tyrosinase といった抗原も SEREX 法で検出できることが報告され、その実用性が示された (27)。その後、胃癌、腎癌、食道癌、大腸癌、肺癌、乳癌など種々の癌において、SEREX 法による腫瘍抗原の同定の試みが開始された (32, 33) (表 1)。強調すべき点は、これらの抗原は癌患者の免疫系が自己の癌に反応して産出した抗体によって同定されたということであり、*in vivo* において患者の免疫系が癌に対してきわめて活発な応答をしていることを示している。

しかし腫瘍免疫療法のターゲットとしての腫瘍抗原を考えるときに、その必要条件は、まず CTL に認識されるものであるか否かである。SEREX 法は、上に述べたとおり比較的簡便な方法であり、Pfreundschuh らによって発表され既に 8 年が過ぎ、数千におよぶ SEREX 同定抗原がデータベース上に登録されているが、CTL に認識されることが確認されているものは、当教室で同定した hsp105 や CLP を含めごく少数に過ぎない (34, 35)。

図 4

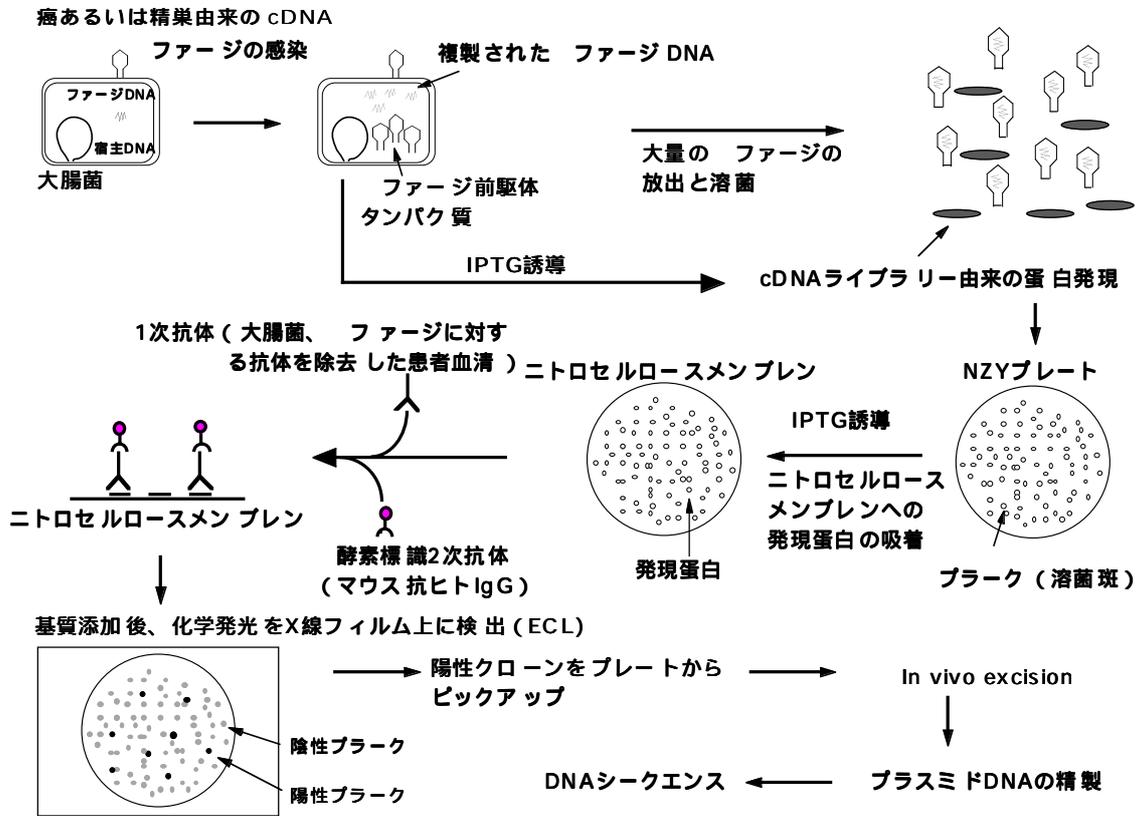


図 4 SEREX 法の概要

大腸菌 (XL-1blue MRF') に感染させた頭頸部癌細胞株あるいは精巣由来の cDNA を発現するλファージを NZY プレート培地上で 42 で培養し溶菌斑 (プラーク) を作らせた。IPTG を浸透させたニトロセルロースメンブレンでプレートを 37 で 3 時間覆うことにより、プラーク中で ファージに組み込んだ頭頸部癌細胞株あるいは精巣由来の cDNA がコードする蛋白を作らせ、この蛋白をニトロセルロースメンブレン上に転写した。血清サンプルから、大腸菌とファージの溶解物とセファロース 4B が充填されたカラムを用いて大腸菌と ファージに対する抗体を除去した後、600 ~ 1200 倍に希釈した。ブロッキング後のニトロセルロースメンブレンを洗浄し、準備した血清サンプルと反応させた。洗浄した後、二次抗体として HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を反応させた。洗浄した後ニトロセルロースメンブレンを ECL と反応させ、血清中の抗体が反応するファージプラークの示す強い化学発光を X 線フィルム上で検出し、写真とプレートを照らし合わせ、陽性プラークを周囲の陰性プラークとともにピックアップした。

表 1

これまでに SEREX 法で同定された主な腫瘍抗原

抗原の特徴	抗原名	同定された腫瘍
cancer/testis antigens	NY-ESO-1	食道癌
shared tumor antigens	HOM-MEL-40	メラノーマ
diferenciation n tigers	tyrosinase	メラノーマ
overexpressed genes	galectin-9	ホジキンリンパ腫
gene amplifications	elf-4γ	肺癌
mutated genes	p53	大腸癌
splice variants	restin	ホジキンリンパ腫
viral antigens	HERV-K10	腎癌
cancer-related autoantigens	CEBP	メラノーマ
cancer-independent autoantigens	UI-snRNP	食道癌
underexpressed genes	HOM-HCC-8	肝細胞癌

5 - 5) Cancer-testis(CT)抗原

CT 抗原と総称される抗原は、名前が示すとおり種々の癌組織および正常組織では testis(精巣)のみに発現する抗原群で、ヒトのメラノーマで同定された最初の癌抗原 MAGE が CT 抗原の代表である (15)。発現パターンから免疫療法の理想的なターゲットと考えられており、同定された CT 抗原をターゲットとした抗腫瘍免疫療法の臨床試験がすでにおこなわれている (24, 25)。CTL クローンを用いた cDNA 発現クローニング法で同定された MAGE、BAGE、GAGE などの CT 抗原 (36, 37)に加えて、SEREX 法でも CT 抗原である NY-ESO-1 と SSX-2 が、それぞれ食道癌 (30)とメラノーマ (27, 38)より、自家血清を用いて同定された。また SCP-1 が腎癌より (39)、CT-7 がメラノーマ細胞株より (40)、アロ血清 (癌細胞のドナーとは異なる患者の血清) を用いて同定された。現在も、新たな CT 抗原を同定しようという試みが継続されている。

CT 抗原がなぜ癌患者の免疫系に認識され、またなぜ免疫治療の理想的なターゲットなのであるのか? 生殖系の細胞には MHC 分子の発現がないか非常に少なく、T 細胞に抗原を提示する能力が小さい。結果として、生殖細胞は免疫系から " 隔離 " されている状態にあり、生殖系細胞のみに発現する分子は免疫系に認識されることもなく、トランスも誘導されていない。しかし、生殖系細胞のみに発現する分子がいったん癌細胞に発現すると、そのペプチド断片が MHC 分子と結合して T 細胞に提示され、免疫反応を惹起すると考えられている。抗腫瘍免疫療法においては、CT 抗原に対する CTL は MHC 分子が存在しない生殖系細胞を攻撃することなく、癌細胞のみを選択的に攻撃すると考えられる (36)。

CT 抗原は、もともと同定された癌に限らず、さまざまな癌に発現する。食道癌より同定された NY-ESO-1 は、メラノーマの約 40%に、また乳癌の 30%にも発現する。また、メラノーマで同定された SSX-2 が乳癌にも発現していることも確認されている。この事実は、CT 抗原が抗腫瘍免疫の標的として多くの癌に応用できる可能性を示しており、その有用性を高めている。しかし、CT 抗原は癌における発現量が高くないため従来の SEREX 法での同定は容易ではない。

5 - 6) 本研究の目的

本研究は精巣 cDNA library を用いた SEREX 法により新たな CT 抗原を同定し、さらにその腫瘍診断および抗腫瘍免疫療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

6 実験方法

6-1) SEREX 法による腫瘍関連抗原遺伝子の単離

5 種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株を混合したものと、正常精巢由来の 2 種類の cDNA 発現 ライブラリー(ZAP Expression Vector)を用いてスクリーニングに用いた。

SEREX は過去に報告された方法を参考にして行った (27) (図 4)。ファージ 1×10^4 pfu / NZY プレート (15 cm) となるように、大腸菌 (XL-1blue MRF') に感染させた λ ファージを NZY プレート培地上で 42 °C で 4 時間培養し溶菌斑 (プラーク) を作らせた。isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) を浸透させた Amersham 社のニトロセルロースメンブレン Hybond-c extra でプレートを 37 °C で 3 時間覆うことにより、プラーク中で ファージに組み込まれた頭頸部扁平上皮癌細胞株、あるいは正常精巢由来の cDNA がコードする蛋白を作らせると同時に、この蛋白をニトロセルロースメンブレン上に転写した。このニトロセルロースメンブレンを 0.5% のスキムミルクを含んだ tris-buffered-saline (TBS) で 4 °C で 16 時間ブロックした。実験に使用するまで -80 °C で保存しておいた血清サンプルから、Bio Dynamics Laboratory 社の大腸菌とファージの溶解物とセファロース 4B が充填されたカラムを用いて大腸菌と ファージに対する抗体を除去した後、1% ウシ血清アルブミン含有 TBS で最終的に 600 ~ 1200 倍に希釈した。ブロッキング後のニトロセルロースメンブレンを 0.05% Tween 20 含有 TBS (TBS-T) で洗浄し、準備した血清サンプルと室温で 2 時間反応させた。TBS-T で洗浄した後、2 次抗体として Southern Biotechnology Associates 社の Horseradish Peroxidase (HRP) 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 1% ウシ血清アルブミン含有 TBS で 2000 倍に希釈してニトロセルロースメンブレンと室温で 1 時間反応させた。TBS と TBS-T で洗浄した後にニトロセルロースメンブレンを Amersham 社の ECL RPN 2106 と 1 分間反応させ、血清中の抗体が反応するファージプラークの示す強い化学発光を X 線フィルム上で検出し、写真とプレートを照らし合わせ、陽性プラークを周囲の陰性プラークらとともにピックアップした。

ついで二次スクリーニングとして 10 cm プレートに一次スクリーニングで拾ったものを 100 個程度まき、血清中の抗体が反応したプラークをクローンとしてピックアップした。

このようなファージプラークから得られた ファージを ExAssist helper phage/SOLR strain system (Stratagene 社) を用いて *in vivo* excision を行うことによりプラスミドにリクローニングした。プラスミド DNA を QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen 社) を用いて精製した後、挿入されている cDNA の塩基配列を ABI Prism 自動 DNA シークエンス装置 (Perkin

Elmer 社) を使用して決定した。得られた塩基配列の遺伝子検索とモチーフ検索および細胞内局在の予測はそれぞれ BLAST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Motif database (<http://www.genome.-ad.jp>) PSORT web site (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)を用いて行った。

6 - 2) Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

TRIZOL reagent を用いて、様々な組織と細胞株から total RNA を抽出した。癌細胞株は熊本大学医学部耳鼻咽喉科および東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから供与頂いた。様々な癌組織、正常組織は熊本大学医学薬学研究部消化器外科学、顎口腔病態学、皮膚機能病学および佐賀大学医学部耳鼻咽喉科学より恵与された。いくつかの正常組織の total RNA は Biochain 社から購入した。各 1 µg の total RNA からランダムヘキサマープライマーを用いて Superscript reverse transcriptase(インビトロジェン社)により各 cDNA を合成した。RT-PCR の各遺伝子特異的プライマーを作成し、PCR 反応は 94 1 分間、58-62 1 分間、72 1 分間で 28-33 サイクル行い、PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで分離してエチジウムブロマイドで染色し特異的バンドを検出した。比較対照のため アクチン特異的なプライマーも同時に用いた。各プライマーのシーケンスは、表 2 に示す通りである。

6 - 3) KM-HN-1 組み換え蛋白の作製

ポリクローナル抗体作製と KM-HN-1 に対する抗体価を解析するために KM-HN-1 組み換え蛋白を作製した。KM-HN-1 の N 末端側 488 アミノ酸 (図 5) をコードする部分を GST 融合蛋白発現ベクター pGEX 4 T- 3 (Amersham Biosciences 社) に組み込み、大腸菌(DH5α)に感染させ 500 ml の Luria broth メディウムで 3 時間震盪培養した後、終濃度 0.1 mM になるように IPTG を加えて、23℃ で 16 時間震盪培養した。培養液を遠心して上清を捨て、ペレットに 20 ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 1% Triton-X, Lysozyme, 1 mM PMSF)を加えてソニケーションし再度遠心した。上清に GSH-アガロース ビーズを入れ 4℃ で 1 時間震盪培養し、10 mM GSH/50 mM Tris-HCl(pH9.6)にて溶出した。これをアジュバントと混合し、ウサギに数回免疫し血清を GST 蛋白を用いたアフィニティーカラムを用いて GST 非結合画分を得た。さらにこれより KM-HN-1-GST 融合蛋白アフィニティーカラムを用いて KM-HN-1 特異的抗体の精製をおこなった。なお免疫および抗体精製はトランスジェニック社に依頼した。

6 - 4) KM-HN-1 の細胞内局在の解析

上記のように作製したポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学解析を行った。KM-HN-1 の全長 cDNA を哺乳動物細胞発現ベクター pCAGGS-IRES-NEO に組み込み COS-7 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入は LipofectAMINE 2000 reagent (Invitrogen 社) を使用した。一過性遺伝子発現細胞と KM-HN-1 を発現する食道癌細胞株 TE3 細胞を 6 穴プレートにまき、PBS 溶液で 3 回洗浄したあと、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS 溶液で 10 分間固定し、PBS 溶液で 3 回洗浄、その後 0.1% Triton-X/PBS と 100% エタノールで 2 分間ずつ処理し、パーミアビリゼーションを行った。続いて 2% ウシ血清アルブミン / PBS にて 30 分間ブロッキングし、100 倍希釈した一次抗体 (ウサギ抗ヒト KM-HN-1 ポリクローナル抗体) を室温で 2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham 社) を 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し PBS で 10000 倍希釈した Rnase を 20 分間反応させ RNA を分解した。PBS で 3 回洗浄し PBS で 500 倍希釈した TOTO-3 を 10 分間反応させ、DNA を染色した。PBS で 3 回洗浄しグリセロールを数滴落としカバーガラスをのせ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

6 - 5) 免疫組織化学的解析

vectastain ABC-PO (rabbit IgG, mouse IgG) キット (Vector Laboratories 社) を用い、アビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法で、免疫染色を行った。一次抗体は、ウサギ抗ヒト KM-HN-1 ポリクローナル抗体を 20 倍希釈で、ホルマリン固定パラフィン包埋切片よりパラフィンを除去して、正常ウマあるいはヤギ血清にて室温で 30 分間ブロックし、一次抗体を 4 で 14 時間反応させた後に phosphate-buffered saline (PBS) で洗った。さらにビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体と室温で 1 時間反応させた後に PBS で洗い、ストレプトアビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼと室温で 1 時間反応させて PBS で洗い、diaminobenzidine で発色させた。対比染色としてメチルグリーンを使用した。

6 - 6) 癌患者血清中の KM-HN-1 特異的抗体価の解析

KM-HN-1 に対する自己抗体価を測定するために、血清と GST-KM-HN-1 融合蛋白を用いた Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)を行った。NUNK 社の 96 ウェルプレートに PBS で 1 ug/ml となるように溶解した GST-KM-HN-1 融合蛋白で 4 から 16 時間コートした。比較対照として GST 蛋白も同濃度でコートした。プレートを 0.05% Tween20 / PBS (PBS-T) で 3 回洗浄後、5% スキムミルク / PBS で室温で 1 時間ブロックした。PBS-T で 3 回洗浄後、1% スキムミルク / PBS で 100 倍希釈した血清を室温で 2 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄後、1% スキムミルク / PBS で 2000 倍希釈した HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体で 1 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄後、TMB substrate を加え 30 分後に H₂SO₄ を加え反応を停止させ、吸光度を測定した。KM-HN-1 特異的抗体価は GST 蛋白に対する吸光度を差し引いて算出した。

6 - 7) 末梢血単核細胞(PBMC)からの KM-HN-1 特異的

CTL 株の樹立とスクリーニング

KM-HN-1 のアミノ酸配列について、日本人に一番多い HLA-A*2402 に結合するペプチドの構造モチーフを有する部分をモチーフ探索データベース (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) で検索し、13 種のペプチドを選択した (図 5)。HLA-A*2402 結合モチーフの概略は、P2 にチロシン、フェニルアラニン、P9 または P10 にロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンが存在することである。これらの合成ペプチド (サワデー社より購入) を用いて健常人の PBMC を刺激し、HLA-A*2402 拘束性にペプチドを認識する細胞株を樹立した。具体的な方法は、(図 6) に示した。

まず全血より Ficoll にて PBMC を分離した後、マイクロビーズ (Miltenyl Biotec 社) をもちいて CD8 陽性細胞と CD14 陽性細胞を分離した。CD8 陽性細胞は凍結保存した。CD14 陽性細胞を GM-CSF (100 ng/ml) と IL-4 (100 U/ml) を加えた 10% ウシ胎児血清入り RPMI1640 メディウム中で培養し 5 日目に TNF- α を 20 ng/ml になるように加えさらに 2 日培養し、成熟樹状細胞 (DC) に分化させ、抗原提示細胞として使用した。CTL の誘導には 10% 自己血清入り RPMI1640 メディウムを使用した。24 穴プレートに 1 ウェルあたり DC を $1-2 \times 10^5$ 個と 5 μ M の peptide を入れ 2 時間後に 35 Gy の放射線を照射した。その後

凍結保存しておいた 2×10^6 個のCD8陽性細胞を入れ培養した。第1日はIL-7 (5 ng/ml)を加えた。またこの日から新しいDCの誘導を始める。第8日第15日に同様のDCを準備し、CD8陽性細胞をRPMI1640で1回洗浄後、DCで再刺激した。この際にIL-7 (5 ng/ml)とIL-2(10 U/ml)を加えた。

ペプチド特異的CTLの誘導の確認はC1R-A2402細胞を標的細胞にしたIFN- γ 産生と ^{51}Cr -release法による細胞傷害試験を指標とした。C1R-A2402細胞は本学滝口教授(ウィルス制御学)より供与頂いたもので、HLAをほとんど発現していないEBウィルス感染Bリンパ球株C1R細胞にHLA-A2402を遺伝子導入した細胞である。IFN- γ の測定は、96穴U底プレート1ウェルあたり 1×10^4 個まき、 $10 \mu\text{M}$ のペプチドを加えたものと加えてないものに 1×10^5 個の培養20日目のCTLを加え、18時間後にELISA法により培養上清中に分泌されたIFN- γ を定量した。また陰性対照群としてC1R細胞にペプチドを加えた群に対する反応も検討した。 ^{51}Cr -release法による細胞傷害の定量はC1R-A2402細胞を ^{51}Cr ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$)で1時間ラベルした後、96穴U底プレートに1ウェルあたり 1×10^4 個まき、その5倍数の培養20日目のCTLを加え、4時間後に培養上清をとって死細胞より放出された ^{51}Cr を測定することにより行った。

6 - 8) HLA-ペプチド結合試験

HLA-A24 分子とペプチドの結合試験は、以前報告されている方法を参考にして行った(41)。まずRMA-S-A*2402細胞を26で16時間培養した。この細胞を20%ウシ胎児血清入りPBSで 2×10^5 個/ウェルとなるように96穴プレートにまき、そこにペプチドを $10^{-3} \sim 10^{-8}\text{M}$ になるように加えて、さらに26で3時間培養した。その後37に温度を上げてさらに3時間培養した。細胞を洗浄してW6/32抗体を用いてHLAクラスIIを染色しFACScanで蛍光強度を測定した。26のままの細胞を染色したものを100%、ペプチドを加えずに37で3時間培養したものを0%として相対的蛍光強度を算出した。

6 - 9) KM-HN-1 特異的 CTL 株の解析

CTLの誘導に用いたペプチドが、癌細胞内でプロセッシングを受けるか否かを検討するために、KM-HN-1陰性の頭頸部癌細胞株HSC-4細胞にKM-HN-1遺伝子の全長を遺伝子導入した細胞(HSC-4-HN-1)を作製した。6-4)に示したCOS-7細胞と同様に遺伝子導入をおこなった後、3 mg/mlのgeneticin(インビトロジェン社)にて遺伝子の高発現細胞を選択した。これを標的細胞として ^{51}Cr -release法による細胞傷害試験を行い、癌細胞のHLAに提示されるかを検討した。

また通常の癌細胞に対する細胞傷害活性を検討するためにHLA-A24陽性

食道癌 (TE-3、TE-10)、HLA-A24 陽性肺癌 (PC-9)、HLA-A24 陰性食道癌 (TE-9)を用いて細胞傷害試験を行った。1 日目に細胞を ^{51}Cr で 1 時間ラベルした後に、96 穴平底プレートに 1 ウェルあたり、 1×10^4 個まく。2 日目にターゲット細胞に対して、5 倍、10 倍、20 倍の数の CTL を加え、4 時間後に培養上清をとって死細胞より放出された ^{51}Cr を測定した。

癌細胞を傷害する CTL が KM-HN-1 特異的に反応している事を確かめるために、非標識標的細胞を用いた阻害試験も行った。上記のような ^{51}Cr -release 法を行う際に ^{51}Cr で標識していない C1R-A2402 を標識細胞の 5 倍、10 倍、20 倍加えた。C1R-A2402 に KM-HN-1 由来ペプチドや陰性対照として HIV のペプチドを加え、傷害活性が阻害されるかどうかを検討した。標識細胞には、HLA-A24 陽性、KM-HN-1 陽性の肺癌細胞株 PC-9 を用いた。

図 5

末梢血単核球ドナー：HLA-A24陽性健常人
 メディウム：10%自家血清添加RPMI-1640

MACSビーズを用いて末梢血単核球を分離

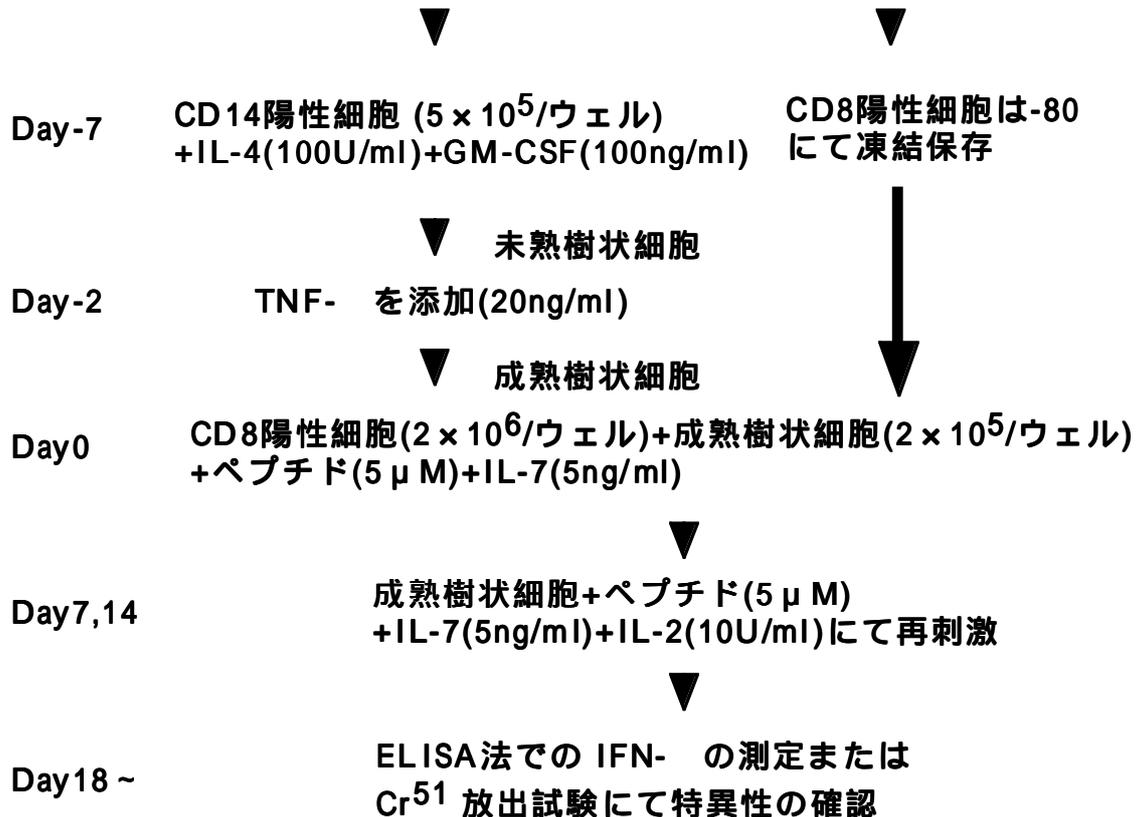


図 5 腫瘍抗原ペプチドに特異的な CTL 株の樹立法

末梢血から Ficoll にて単核球を分離し CD8 抗体と CD14 抗体を付着させた MACS ビーズで、それぞれ CD8 陽性細胞と CD14 陽性細胞を分離した。CD8 陽性細胞は、凍結保存した。CD14 陽性細胞は、GM-CSF と IL-4 を入れたメディウム中で 6 穴プレート 1 ウェルあたり 5×10^5 コでまいた。5 日目に TNF- α を添加して、成熟樹状細胞に分化させた。一度洗浄した後、 2×10^5 コの成熟樹状細胞と $5 \mu\text{M}$ のペプチドを 24 穴プレートにいれ、2 時間静置した後、35Gy の放射線を照射した。そこに 2×10^6 コの CD8 陽性細胞と IL-7 を加えた。その日から新たに樹状細胞の誘導を開始した。7 日と 14 日後に同様に樹状細胞とペプチドで再刺激した。その際、IL-2 もさらに加えた。18 日目以降の細胞を使用して、C1R-A2402 細胞を標的細胞として IFN- γ 産生量や ^{51}Cr 放出試験にて CTL 株のペプチド特異性を確認した。

表 2

腫瘍抗原遺伝子の RT-PCR に用いたプライマー 1

腫瘍抗原	プライマーの塩基配列	
KM-HN-1	sense	5'-CCATCCCAGATACATTCCGAGGAC-3'
	antisense	5'-GGTCGAGGAAGGACAGTGTGT-3'
KM-HN-2	sense	5'-CCATGTGCTAGAGACAGCCAACAA-3'
	antisense	5'-ATCTTGCATGATCCAGGGAGGTTC-3'
KM-HN-3	sense	5'-ACCATCTGGCTCCTCATCGTCCTC-3'
	antisense	5'-CCCACCCCAATCATAGGCATAGTC-3'
KM-HN-4	sense	5'-CGGAGGAGGAACGAAAACGCAGAA-3'
	antisense	5'-TGCTTCCTTGAGAGATGGTCGTTG-3'
KM-HN-5	sense	5'-ACAGAGGAGCACCAAGGAGAAGAT-3'
	antisense	5'-TCTTCAGGGACTCGGAGGCTTTGC-3'
KM-HN-6	sense	5'-AAATCAAGAGCCCGAGCCCAGCAC-3'
	antisense	5'-TGAGGGCTGGCTGTTGGCTTTCT-3'
KM-HN-7	sense	5'-CTCCGCGCCCTGAACTCAATATGT-3'
	antisense	5'-CTTTGGCTTCTTGCTCTTGGAGTG-3'
KM-HN-8	sense	5'-GAGAGGAAGAAGAAGAGGCAGCAG-3'
	antisense	5'-ACCGCCCCTGGACTACTTATGGAG-3'
KM-HN-9	sense	5'-AGATGAGGGGAAGATGTCCGTGTC-3'
	antisense	5'-AAGCTCTGTCTGTGGCTCTTGTTTC-3'
KM-HN-10	sense	5'-AGCCTGAGATCACAAAGCCAGTCA-3'
	antisense	5'-CTTCTGTTATACTGTGGGGCTCTG-3'
KM-HN-11	sense	5'-AGTCAGCGACGGAAAGAGTATGAG-3'
	antisense	5'-GTGGAGAGGATGCTGCTGAAGGAA-3'
KM-HN-12	sense	5'-ATCCCACAAAAGATGGCGATGACG-3'
	antisense	5'-TGCTGTGCCGAGGTTTGTAAGAGG-3'
KM-HN-13	sense	5'-AGACGGGCATGGTGGTACACTCCT-3'
	antisense	5'-AGGCAGTGTCCCAGGTAGTGTTC-3'

表 2 (つづき)

腫瘍抗原遺伝子の RT-PCR に用いたプライマー 2

腫瘍抗原		プライマーの塩基配列
KM-HN-14	sense	5'-GTGGCTTTAATTTCCCTCTTGC-3'
	antisense	5'-GTAAAGGACGAGTTGTAAGCTTGG-3'
KM-HN-15	sense	5'-GTGAAGGGTGCCCCAGCAAATGGA-3'
	antisense	5'-CCTTCCCAACAGCCAGACCAATGA-3'
KM-HN-16	sense	5'-GGCAGGGATTGGGGAATTTTCTG-3'
	antisense	5'-CTCAATGGAGCAGTTAGGGCAGAC-3'
KM-HN-17	sense	5'-TGTGGCCTTGGGCACGAACTCAGT-3'
	antisense	5'-TGAAGTCGTCGGTGGGGTCGTTGT-3'
KM-HN-18	sense	5'-ACTTCTGTGTAGCACCTGGGTCAG-3'
	antisense	5'-CATGGACGGAGGTTGAGATGAAGC-3'
KM-HN-19	sense	5'-CTGTGATCCTCATCCCTCCAAGAA-3'
	antisense	5'-CACAGACACATCATCAGGGCCTAA-3'

7 実験結果

7-1) 腫瘍抗原遺伝子の同定

頭頸部扁平上皮細胞株と正常精巢のそれぞれから樹立された、独立した約 500 万個のクローンを含む cDNA 発現ライブラリー(ZAP Expression Vector)より、6 例の頭頸部扁平上皮癌患者血清を用いて約 600 万クローンをスクリーニングし 28 個の患者 IgG に反応するクローンを得た。各クローンの塩基配列を解析し、19 種類の遺伝子を同定した(表 3)。その内訳は、既知の遺伝子が 12 種類(表 4)、未知の遺伝子が 7 種類であった(表 5)。

12 種類は既知の遺伝子であった(表 4)。KM-HN-3 はカゼインキナーゼ 1 ガンマ 1S (CK1 1S) と相同性を認めた。CK1 は真核細胞において最も多く認められるセリン/スレオニンキナーゼである。CK1 には 7 つのアイソフォーム(、 、 1、 2、 3、 、)が報告されていたが、 1 にはさらに 2 コのサブタイプ 1S と 1L が存在することが最近報告され、他の CK1 と異なり 1S は正常組織においては精巢特異的に発現することが分かっている。KM-HN-5 は MAGE A4 と相同性をもつ。これは CT 抗原ではじめに同定された MAGE A1 のファミリー遺伝子である。MAGE A4 も癌患者の CTL の認識抗原である事が分かっている。既知の遺伝子では核に局在するものが 6/12 と最も多かった。

未知の遺伝子について細胞内局在予測プログラム (PSORT <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)を用いて検索したところ、4 種類が核に、2 種類が細胞質に、1 種類が小胞体に局在すると推定された。MOTIF database をもちいて検索したところ、KM-HN-2 にはセリン/スレオニンキナーゼドメインとロイシンジッパーモチーフが、KM-HN-4 には免疫グロブリンドメインが、KM-HN-8 にはフォークヘッドドメインが、KM-HN-17 にはソマトメジン B ドメインとフォンビーレブランド因子タイプ D ドメインが認められた。KM-HN-7 と KM-HN-13 には特定のモチーフは認められなかった(表 5)。

表 3

頭頸部癌細胞株および正常精巢を用いた SEREX 法により

同定された 19 種類の腫瘍抗原遺伝子

抗原遺伝子	相同性を示す遺伝子	cDNA ライブラリー
KM-HN- 1	EST	testis
KM-HN- 2	KIAA0175	testis
KM-HN- 3	casein kinase 1 ,gamma 1S	testis
KM-HN- 4	Homo sapiens clone HH409 unknown mRNA	testis
KM-HN- 5	MAGE4a	testis
KM-HN- 6	replication protein A2	testis
KM-HN- 7	KIAA0729	SCCHN
KM-HN- 8	DKFZP564M182	SCCHN
KM-HN- 9	NFR B binding protein	SCCHN
KM-HN-10	nuclear pore complex protein	testis
KM-HN-11	NF-E2-related factor 2	SCCHN
KM-HN-12	integrin 6	SCCHN
KM-HN-13	FLJ00016	SCCHN
KM-HN-14	ribosomal protein L35a	testis
KM-HN-15	karyopherin(importin) 3	testis
KM-HN-16	mitochondrial ribosomal protein S10	testis
KM-HN-17	BK65A6.2 Sushi domain (SCR repeat) containing	SCCHN
KM-HN-18	human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 1	SCCHN
KM-HN-19	UBE3A	SCCHN

表 4

機能などが既知の 12 種類の腫瘍抗原遺伝子

抗原遺伝子	細胞内局在	機能 / モチーフ
KM-HN- 3	不明	serine/threonin kinase
KM-HN- 5	不明	MAGE gene family
KM-HN- 6	核	DNA replication, DNA repair
KM-HN- 9	核	transcription factor
KM-HN-10	核膜	nuclear import/export
KM-HN-11	核	transcription factor
KM-HN-12	細胞膜	signal transduction, cell adhesion
KM-HN-14	リボゾーム	RNA binding protein,
KM-HN-15	核	nuclear/cytoplasm transport
KM-HN-16	ミトコンドリア	catalyze protein synthesis
KM-HN-18	核	transcription factor
KM-HN-19	細胞質	protein degradation

表 5

機能などが不明の 7 種類の腫瘍抗原遺伝子

抗原遺伝子	予測される細胞内局在	機能 / モチーフ
KM-HN- 1	核	leucine zipper
KM-HN- 2	核	serine/threonin kinase domain
KM-HN- 4	核	immunoglobulin domain
KM-HN- 7	細胞質	none
KM-HN- 8	核	fork head domain
KM-HN-13	小胞体	none
KM-HN-17	細胞質	von Willebrand factor type D domain

7-2) 腫瘍抗原遺伝子の発現

13 種類の癌組織と 13 種類の正常組織の mRNA を用いて、これらの遺伝子の発現を RT-PCR で検出し比較した (表 6)。

2 種類の遺伝子 KM-HN-1、3 はいくつかの癌組織で発現するが、正常組織においては精巣以外に発現を認めず、CT 抗原と同様の発現パターンを示す事が分かった。3 種類の遺伝子 KM-HN-2、4、5 は正常組織で精巣以外にそれぞれ大腸、心臓、脳で発現していた。6 種類の遺伝子 KM-HN-6~11 は 3 か所以上組織で発現しており、8 種類の遺伝子 KM-HN-12~19 は調べた全ての組織で発現していた。KM-HN-5/MAGE-A4 は CT 抗原と報告されていたが、我々の実験では正常脳にも発現を認めた。癌組織では KM-HN-11~16 は全てで発現していた。KM-HN-17~19 は正常組織で全て発現していたが、癌組織では発現していないものがあった。KM-HN-8 は頭頸部癌では発現を認めなかった。KM-HN-11 は正常脳で発現を認めなかったが、脳腫瘍では 2 例中 2 例で発現していた。

2 種類の新規 CT 抗原 KM-HN-1 と KM-HN-3 を同定したが、KM-HN-3 については、そのサブタイプでありユビキタスに発現する CK1 1L と 27 アミノ酸しか違いがないため、癌ワクチンとして使用しにくいと考え、KM-HN-1 についてさらなる解析を行った。

7-3) KM-HN-1 のクローニング

KM-HN-1 は新規遺伝子であったため全長のクローニングを行った。KM-HN-1 は 2499 塩基対の翻訳領域をふくむ約 2900 塩基対の遺伝子であった。この遺伝子には 5' 非翻訳領域にコザック配列があり、また 3' 非翻訳領域にポリアデニレーションシグナルとポリアデニレーションテイルを含んでおり、完全長配列であると推定された。またデータベース検索の結果この遺伝子は染色体の 4q35.1 領域に存在することが分かった。モチーフ検索の結果からは、ロイシンジッパーモチーフ、コイルドコイルドメイン、小胞体膜ドメインを有することも分かった (図 6)。

表 6

13 種類の正常臓器と癌組織での腫瘍抗原 mRNA の発現

		腫瘍抗原遺伝子																		
		HN-1	HN-2	HN-3	HN-4	HN-5	HN-6	HN-7	HN-8	HN-9	HN-10	HN-11	HN-12	HN-13	HN-14	HN-15	HN-16	HN-17	HN-18	HN-19
正常組織	脳	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	++	++	++	++	+	+	+
	心臓	-	-	-	++	-	-	++	+	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+
	肺	-	-	-	-	-	+	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	+
	肝臓	-	-	-	-	-	+	++	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	腎臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+	++	+	+	++	+	+
	精巣	+	++	+	+	++	++	++	+	+++	++	++	++	+	+	++	++	++	+	+
	胃	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	小腸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	大腸	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	脾臓	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	骨格筋	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	胎盤	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	咽頭	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
癌組織	舌1	+++	-	+++	-	++	++	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	舌2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	舌3	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	喉頭	-	++	-	-	-	+	+	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	+	+
	歯肉	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	顎下腺	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	++	++	+	+	++	++	++	++	+
	甲状腺	+	-	-	++	+	++	+	-	-	-	++	++	+	+	++	++	-	-	+
	脳1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	脳2	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	胃	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	肺1	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
	肺2	+	+++	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
	膵臓	++	-	++	-	++	++	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+

発現の強さを4段階で示す。+++：強、++：中、+：弱、-：なし

図 6

1	MSPEKQHREEDEVDSVLLSASKILNSSEGVKESGCS <u>SDTEYGCIAESENQI</u>	50
	p1	
51	<u>QPOSALKVLOOQLE</u> <u>ESFOALRMOTL</u> <u>QNVSMVQSEISEILNKSIIEVENPOF</u>	100
	p2	
101	<u>SSEKNL</u> <u>VFGTRIEKDL</u> <u>PTENQEEENLSMEKSHHFEDSKTLHSVEEKLSGDS</u>	150
	p3	
151	<u>VNSLPQSVNVPSQIHSEDTLTLRTSTDNLSSNIIIHPSENSILK</u> <u>INYNNE</u>	200
201	<u>YRFL</u> <u>PTAPPNVMSQADTVILDKSKITVPFLKHGFCENLDDICHSIKQMK</u> E	250
251	<u>ELQKSHDGEVALTNELQTLQTDVHRNGKYDMSPIHQDKMNF</u> IK <u>EEENLD</u>	300
	p4	
301	<u>GNLNEDIKSKRISELEALVKLLPFRET</u> VS <u>KFHV</u> <u>HFCRKCKKL</u> <u>SKSEMHR</u>	350
351	<u>GKKNEKNNKEIPITGKNITDLKFHSRVP</u> RY <u>TL</u> S <u>FLDQTKHEMKDKERQPF</u>	400
	p5	
401	<u>LVKQGSIISENEKTSKVN</u> SV <u>TEQCVAKIQYLO</u> <u>NYLKESVQI</u> <u>QKKVMELES</u>	450
	p6	p7
451	<u>ENLNLKSKMKPLIFTTQSLIQV</u> E <u>TYEKQLKNL</u> <u>VEEKSTIQSKLSKTEEY</u>	500
501	<u>SKECLKEFKK</u> II <u>SKYNVLOGQNK</u> T <u>LEEKNIQLSLEKQOMMEALDQLKSKE</u>	550
551	HKTQSDMAIVNENNRMSIEMEAMKTNILLIQDEKEMLEKKT <u>HQLLKEKS</u>	600
601	SLGNELKESQLEIMQLKEKERLAKTEQETLLQIIETVKDEKLNLETTLQE	650
	p8	p9
651	STAARQIMEREIENIQ <u>TYQSTAEENFL</u> QEIKN <u>AKSEAS</u> <u>IYKNSLSEI</u> GKE	700
	p10	
701	CEMLSKVMETKTDNQILKEELKKHSQENI <u>KFENSISRL</u> TEDKILLENYV	750
	p11	p12
751	RSIENERDTLEFEMRHLQR <u>EYLSLSDKI</u> CNQHN <u>DP</u> SKT <u>TYISRREKF</u> HFD	800
	p13	
801	NYTHEDTSSPQSRPLASDLK <u>YFKVKDRTL</u> KHH	833

図 6 KM-HN-1 蛋白のアミノ酸配列

予測されるヒト KM-HN-1 蛋白のアミノ酸配列。下線は KM-HN-1 組み換え蛋白を作製した場所を示す。□ は HLA-A2402 結合モチーフをもつペプチドで CTL の誘導のために合成した場所を示す。

7-4) KM-HN-1 の癌組織および癌細胞株での発現解析

7-2) で示したとおり KM-HN-1 は正常では精巣にのみ発現し、癌組織では頭頸部癌、胃癌、肺の腺癌、膀胱癌で発現していた。RT-PCR 法を用いてその他の癌組織での発現や癌細胞株での発現を調べたところ、癌組織では肝細胞癌、悪性黒色腫でも発現を認め、癌細胞株では頭頸部癌、食道癌、胃癌、肺の腺癌・扁平上皮癌、肝細胞癌、大腸癌、膀胱癌、悪性黒色腫で発現を認めた(図 7、8、表 7)。

7-5) KM-HN-1 の細胞内局在の解析

KM-HN-1 の組み換え蛋白をウサギに免疫し、抗ヒト KM-HN-1 ポリクローナル抗体を作製した。まず抗体が KM-HN-1 蛋白と反応する事を確認するために、KM-HN-1 を COS-7 細胞に一過性遺伝子導入した細胞を染色した。発現ベクターのみを遺伝子導入した細胞と比較した。KM-HN-1 を導入した細胞のうち約 30%の細胞が染色されたのに対し、発現ベクターのみを導入した細胞は全く染色されなかったため、この抗体は KM-HN-1 蛋白に反応する事が分かった(図 9A-C)。

そこで KM-HN-1 を高発現する食道癌細胞株 TE3 細胞を用いて蛍光染色した。また上記のとおり DNA を TOTO-3 で二重染色した。間期では核全体にび慢性に染色され(図 9D-F)、分裂期では染色体に局在して染色されることが分かった(図 9G-L)。

7-6) KM-HN-1 の免疫組織化学的解析

正常精巣およびいくつかの癌組織についてパラフィン標本を用いて KM-HN-1 蛋白の発現を検討した。精巣においては主に精祖細胞と精母細胞の細胞質が染色されたが、支持細胞や間細胞は染色されなかった(図 10)。食道癌標本では癌細胞は染色されないもの、核が染色されるもの、細胞質が染色されるものといったようにヘテロジニアスに染色された(図 11A、B)。乳癌、大腸癌標本では癌細胞は均一に細胞質がより強く染色された(図 11C-F)。

図 7

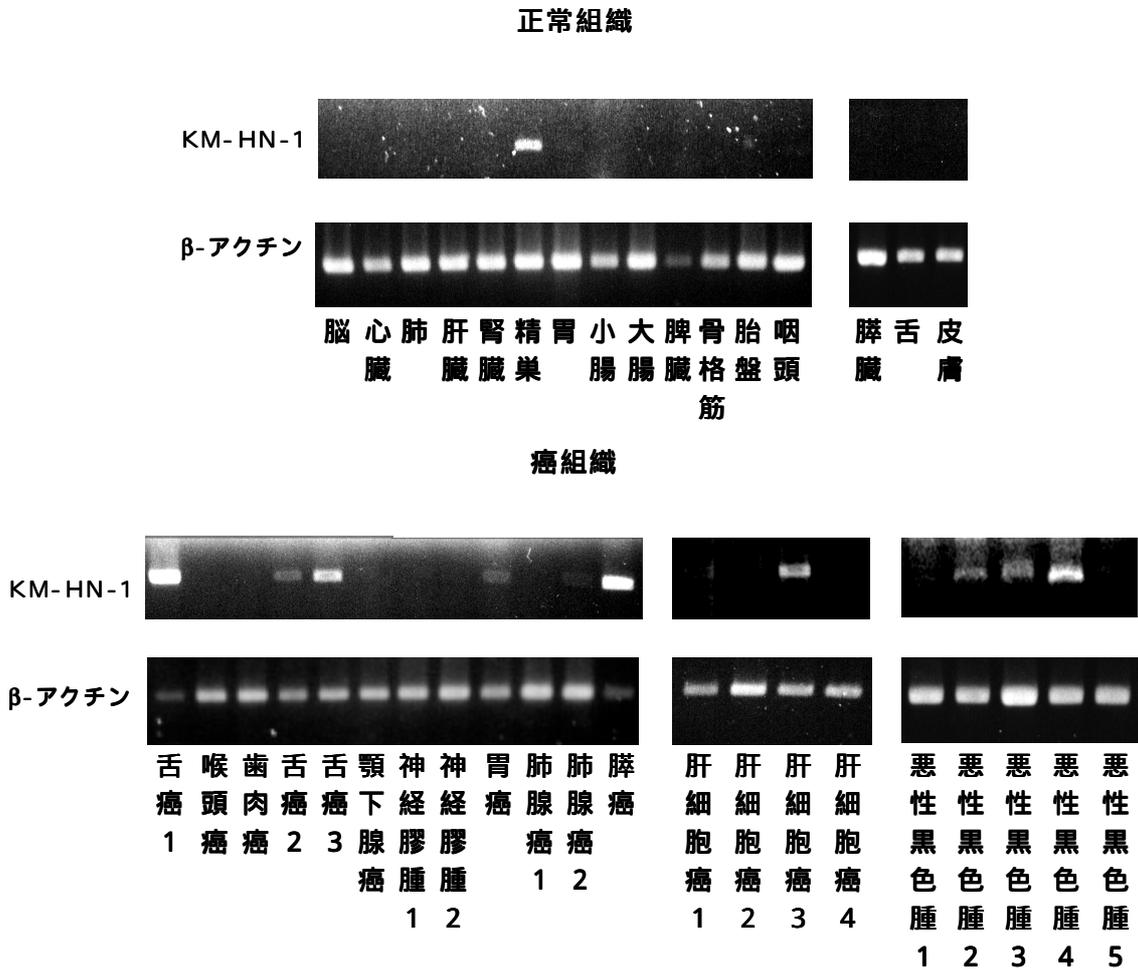


図 7 RT-PCR による各組織の KM-HN-1 mRNA の発現解析

癌組織 21 種類、正常組織 16 種類について KM-HN-1 mRNA の発現を解析した。1 μ g の total RNA を用いて cDNA を合成した。KM-HN-1 は 30 サイクルの PCR を行った。RNA 量のコントロールとして、 β -アクチンの PCR を行った(25 サイクル)。

図 8

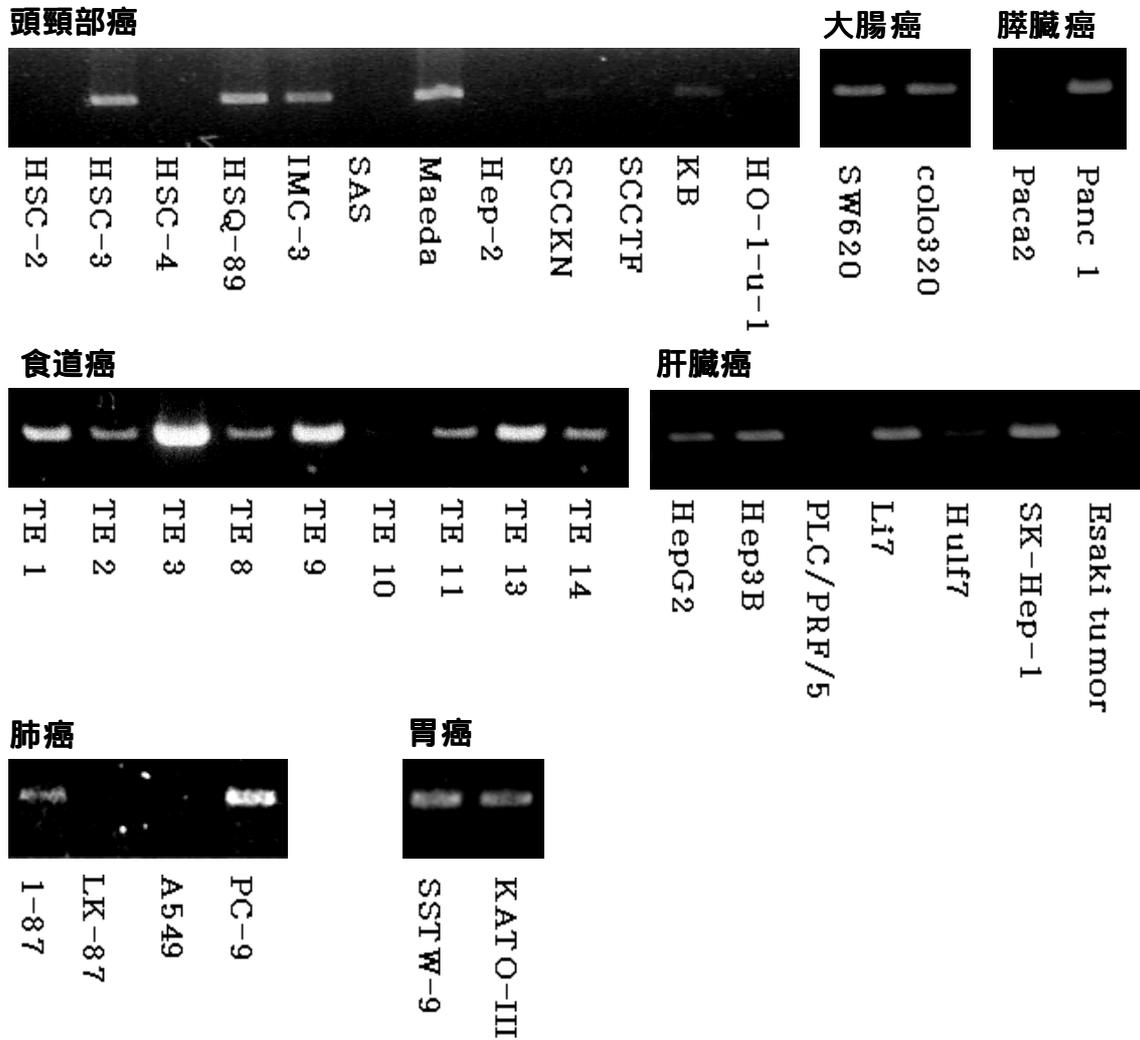


図 8 RT-PCR による癌細胞株における KM-HN-1 mRNA の発現解析

頭頸部癌 12 種類、食道癌 9 種類、肝細胞癌 7 種類、肺癌 4 種類、大腸・胃・膵臓癌各 2 種類について KM-HN-1 mRNA の発現を解析した。1 μ g の total RNA を用いて cDNA を合成し、30 サイクルの PCR を行った。

図 9

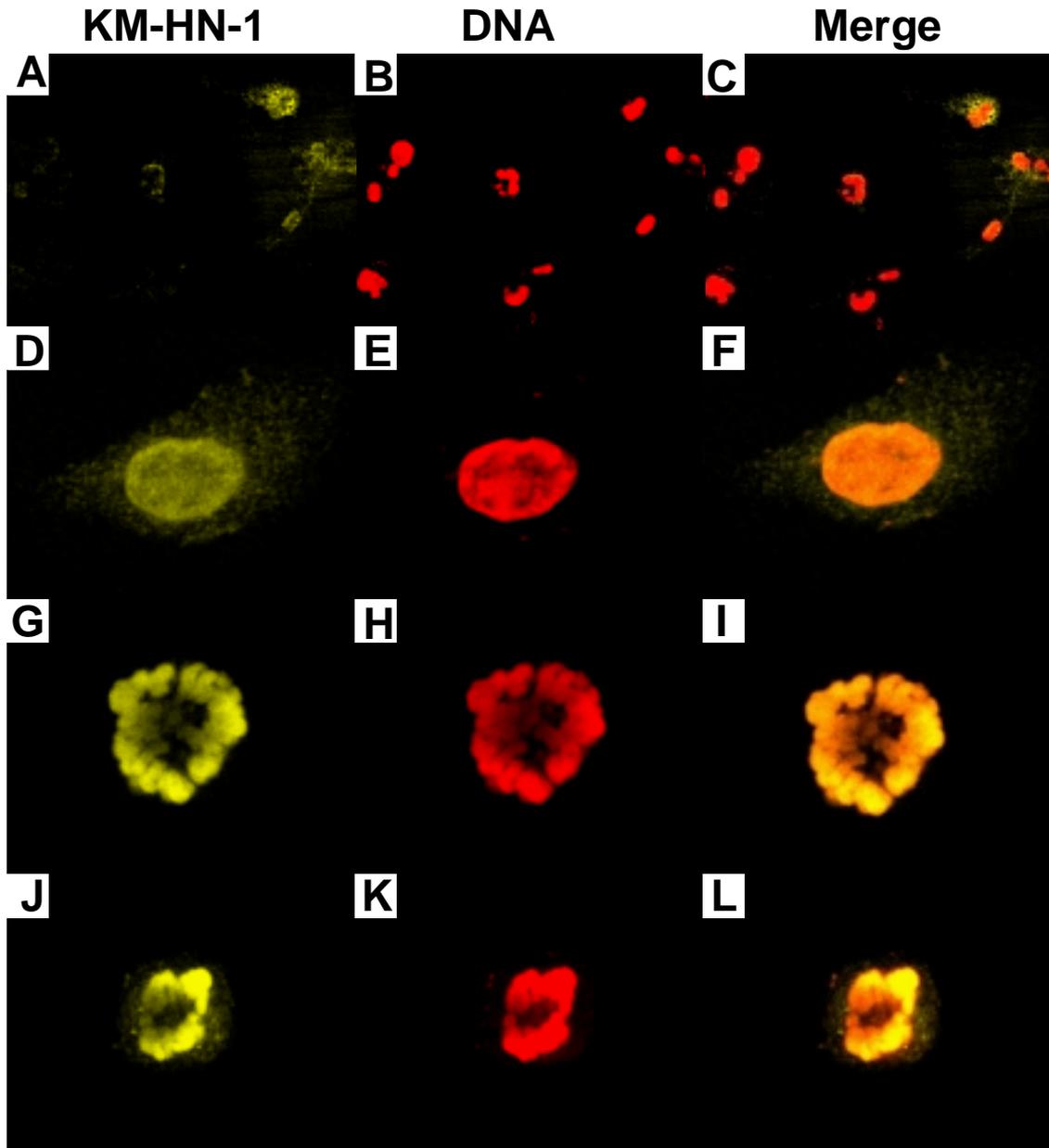


図 9 KM-HN-1 の細胞内局在解析

A-C. COS-7 細胞に KM-HN-1 遺伝子を一過性遺伝子導入した細胞の蛍光免疫染色像。約 30%の細胞が染色されている。D-L. KM-HN-1 を強発現している食道癌細胞株 TE3 細胞の染色像。D. 間期の細胞は核がび漫性に染色されている。G, J. 分裂期の細胞は染色体と同じ場所が染色されている。A, D, G, J は 1 次抗体に抗 KM-HN-1 抗体、2 次抗体に Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体を使用。B, E, H, K は TOTO-3 にて DNA を染色。C, F, I, L は重合像を示す。

図 10

正常精巣

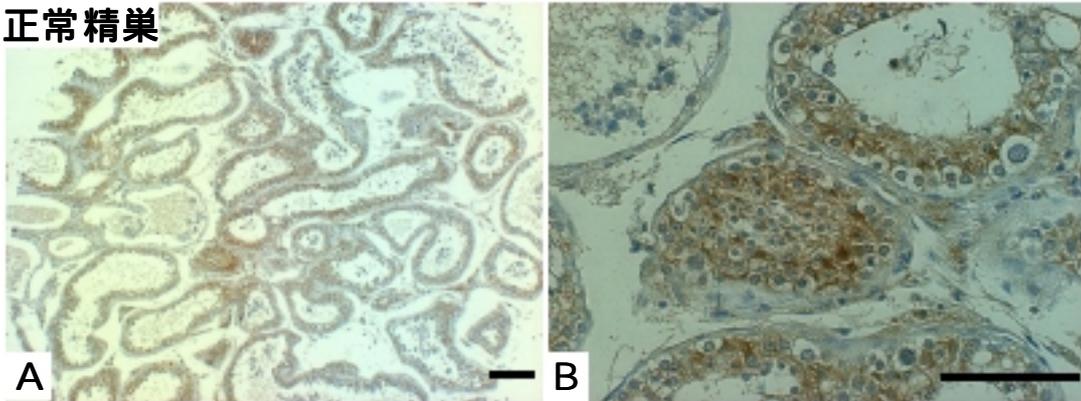


図 10 正常精巣における KM-HN-1 の免疫組織化学的解析

A. 弱拡大像 (40 倍) B. 強拡大像 (200 倍)。スケールバーは共に 100 μm 。精粗細胞、精母細胞、精子細胞は細胞質を中心に染色されている。支持細胞、間細胞は染色されていない。

図 1 1

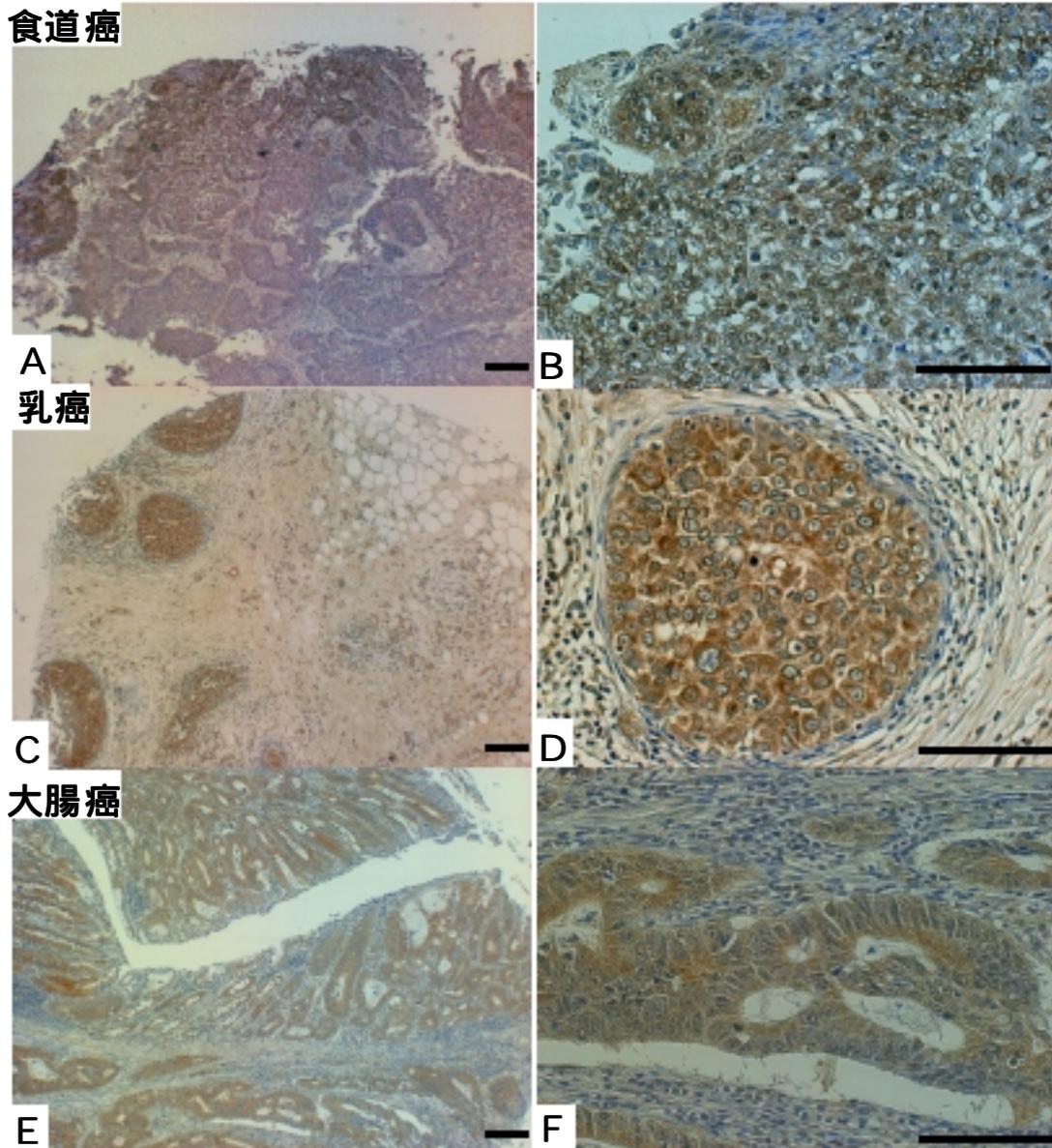


図 1 1 癌組織における KM-HN-1 の免疫組織化学的解析

A, B: 食道 C, D: 乳腺 E, F: 大腸

A, C, E は弱拡大像 (40 倍) B, D, F は強拡大像 (200 倍) スケールバーは全て 100 μ m

食道癌では染色される癌細胞と染色されない癌細胞が混在している。乳癌と大腸癌では、癌細胞は均一に染色されている。

7-7) 癌患者血清中の KM-HN-1 特異的抗体価の解析

上記のように KM-HN-1 は様々な癌において発現することが確認され、また元々SEREX 法にて同定した抗原であることから、癌患者血清中で KM-HN-1 特異的抗体が産生されている可能性があると考え、抗体価を間接的 ELISA 法を用いて定量的に測定した。健常人の平均値+標準偏差を正常上限としたところ、抗体価の増加は健常人では 16 人中 1 人であったのに対して食道癌 (6 人中 6 人)、胃癌 (14 人中 11 人)、肝細胞癌 (14 人中 11 人)、肺癌 (7 人中 5 人)、大腸癌 (21 人中 14 人)、悪性黒色腫 (33 人中 23 人)、頭頸部癌 (21 人中 14 人)、胆管癌 (6 人中 3 人)、膵癌 (11 人中 5 人)、乳癌 (10 人中 4 人) という結果であった。陽性率について健常対照と各癌患者群で χ^2 検定を行ったところ、表 7 に示すとおり調べた全ての癌で有意な陽性率の増加がみられた ($p < 0.05$)。また健常対照群との平均値の差については t-検定を行い、こちらも全ての癌患者群で抗体価の増加がみられた ($p < 0.05$)。(図 12、表 7)。また、ここで具体的なデータは示さないが、男女間、年齢、癌の進行度などについても統計学的検定を行ったが、これらについては有意差は認めなかった。さらに治療前後や再発後の抗体価の変動を悪性黒色腫患者 10 例について検討したが、術後に抗体価が低下する例や再発後に増加する例はなかった。

図 1 2

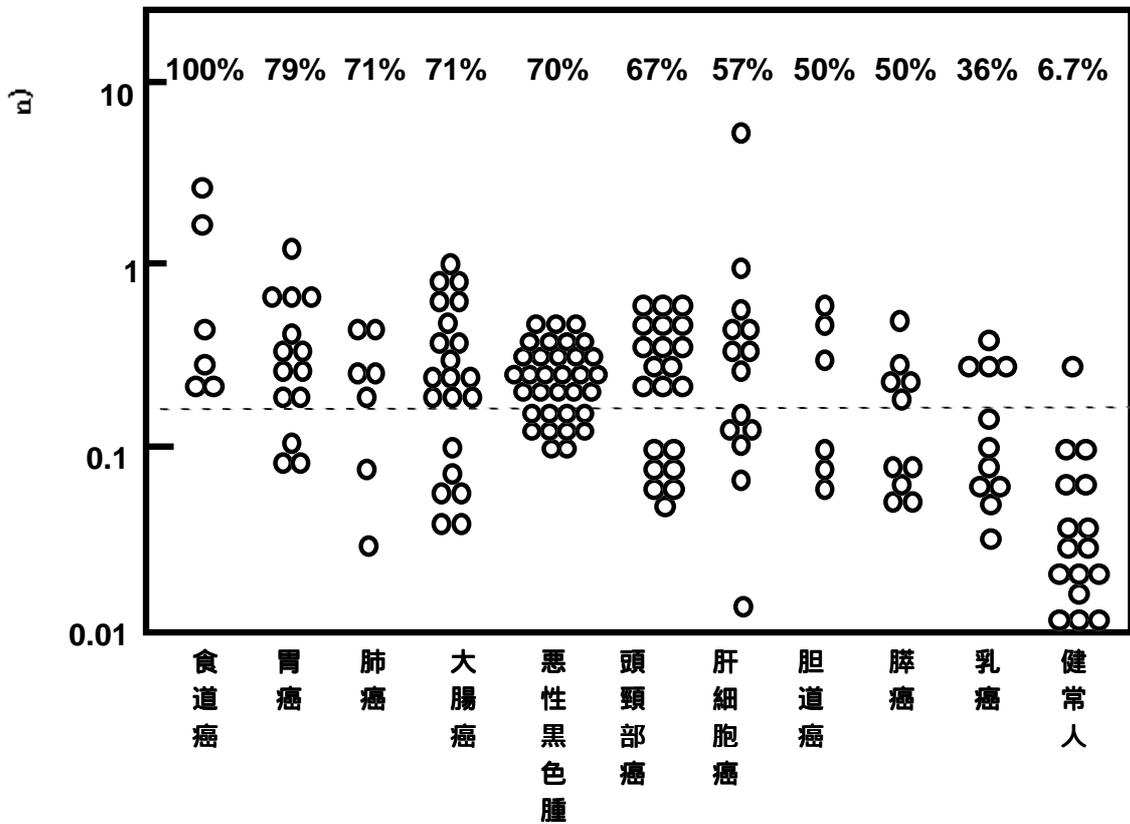


図 1 2 ELISA 法による各種癌患者および健常人血清中の KM-HN-1 特異的抗体価の測定

特異的抗体価は ELISA 法を用いて測定した。抗原として KM-HN-1-GST 融合蛋白を、一次抗体として 100 倍希釈した血清を、二次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を使用して吸光度を測定することで KM-HN-1 にたいする IgG 抗体価とした。抗原に GST 蛋白を使用した時の吸光度との差で特異的抗体価とした。点線は健常人の (平均値 + 標準偏差) の値でこれを正常上限としたときの異常値の割合をパーセントで示す。

表 7

各種癌患者の癌組織における KM-HN-1 の発現と血清中の特異的抗体価の解析

腫瘍臓器	KM-HN-1 の発現(RT-PCR)		KM-HN-1 特異的抗体価 ^A					
	陽性数 / 検体数		年齢	吸光度			有意差検定 (p 値)	
	腫瘍組織	癌細胞株	平均	平均	標準偏差	陽性数 / 検体数 ^B (陽性率)	χ^2 検定 ^B (陽性率)	t 検定 ^C (平均値の差)
健常人	-	-	63	0.067	0.079	1/16 (6%)	-	-
頭頸部癌	3 / 5 (60%)	5 / 12(42%)	59	0.209	0.096	14/ 21 (67%)	<0.05	<0.01
食道癌	-	8 / 9 (89%)	59	0.744	0.832	6 / 6 (100%)	<0.01	<0.01
肺癌	1 / 2 (50%)	2 / 4 (50%)	64	0.186	0.132	5 / 7 (71%)	<0.01	<0.01
乳癌	-	-	50	0.168	0.104	4 / 10 (40%)	<0.05	<0.01
胃癌	1 / 1(100%)	2 / 2 (100%)	71	0.370	0.288	11/ 14 (79%)	<0.01	<0.01
肝細胞癌	-	5 / 7 (71%)	68	0.640	1.465	11/ 14 (79%)	<0.01	<0.05
胆道癌	-	-	70	0.265	0.186	3 / 6 (50%)	<0.05	<0.01
膵癌	1 / 1(100%)	2 / 2 (100%)	58	0.154	0.096	5 / 11 (45%)	<0.01	<0.01
大腸癌	-	2 / 2 (100%)	66	0.232	0.148	14/ 21 (67%)	<0.01	<0.01

^A 特異的抗体価は ELISA 法を用いて測定した。抗原として KM-HN-1-GST 融合蛋白を、一次抗体として 100 倍希釈した血清を、二次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を使用して吸光度を測定することで KM-HN-1 にたいする IgG 抗体価とした。抗原に GST 蛋白を使用した時の吸光度との差で特異的抗体価とした。

^B 健常人の平均+標準偏差 (0.146) を正常上限として各群の陽性率を計算し、健常人群のそれとの有意差を χ^2 検定で検討した。

^C 患者群における吸光度の平均値と健常対照群のそれとの有意差については t 検定で検討した。

7 - 8) KM-HN-1 特異的 CTL 株の樹立

2 人の HLA-A*2402 陽性の健常人から 6 種類の KM-HN-1 特異的 CTL 株が樹立できた。これらの CTL 株は C1R-A2402 細胞に当該ペプチドを加えたときのみ細胞傷害活性を示した。これらの抗原特異性や HLA 拘束性は表 8 にまとめてある。また HLA-A2402 を発現していない親株の C1R 細胞に当該ペプチドを加えても細胞傷害活性は示さなかった。加えるペプチドの濃度を変えたところ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で傷害活性が認められた (図 14、表 8)。

これらの CTL 株が誘導できた 5 種類のペプチドが、細胞内で KM-HN-1 蛋白よりプロセスされて産生され HLA 分子により提示されるかどうかを検討するために、HLA-A*2402 陽性で KM-HN-1 を発現していない頭頸部癌細胞株 HSC-4 に、全長の KM-HN-1 を遺伝子導入した細胞に対する細胞傷害試験を行った。5 種類のペプチドのうち 2 種類のペプチド p3、p7 で誘導された CTL 株は遺伝子導入した細胞のみを傷害したが、その他の CTL 株は、傷害活性を示さなかった (表 8)。この結果は HLA 分子とペプチドの結合親和性によるものではないかと考え、RMA-S-A*2402 細胞を用いて HLA-ペプチド結合試験を行った。図 13 に示すとおり p7 は比較的強い結合を示したが、p3 はこれらの中で結合が一番弱いもののひとつであった。p9 や p11 は p3 に比べ 10~100 倍の IC_{50} を示したが、KM-HN-1 遺伝子導入株は傷害しないという結果から、少なくともこれらの細胞内では p3、p7 以外のペプチドはプロセッシングを受けないのではないかと考えられた。

7 - 9) KM-HN-1 特異的 CTL 株の癌細胞に対する 細胞傷害活性の解析

4 種類の癌細胞株のうち、3 種類 (TE-3、TE-10、PC-9) が HLA-A*2402 陽性で、3 種類 (TE-3、TE-9、PC-9) が KM-HN-1 陽性である。p3、p7 で誘導した 2 つの CTL 株は TE-3、PC-9 を傷害したが、HLA-A*2402 もしくは KM-HN-1 が陰性の TE-9 と TE-10 は傷害しなかった。また p9、p11、p12 で誘導した CTL 株はいずれの細胞も傷害しなかった。以上より p3、p7 で誘導した CTL 株は KM-HN-1 特異的で HLA-A*2402 拘束性に癌細胞を傷害した

と考えられた。このことをより確実にするため非標識細胞をもちいた阻害試験を行った。その結果、非標識の C1R-A*2402 細胞に p3 もしくは p7 を加えたときだけ傷害活性が阻害されたが、ペプチドを加えないときや無関係の HIV-nef 由来のペプチドを加えたときには阻害を認めなかった。このことから KM-HN-1 特異的 CTL が癌細胞傷害活性をもつことがより確実になった。

表 8

健常人 PBMC から誘導した CTL 株の KM-HN-1 特異性と HLA-A24 拘束性

CTL 株	target cells	HLA class I alleles	peptide(10 μM)	% specific lysis ^A	
				E/T ratio=5	
1-p3	C1R-A*2402	A*2402	p3	<u>16.6</u>	
			HIV-nef	1.5	
			none	2.5	
1-p7			p7	<u>25.4</u>	
			HIV-nef	1.1	
			none	1.6	
1-p9			p9	<u>21.2</u>	
			HIV-nef	0.7	
			none	0.4	
1-p11			p11	<u>44.1</u>	
			HIV-nef	0.2	
			none	0.7	
1-p12			p12	<u>20.6</u>	
			HIV-nef	2.3	
			none	2.9	
2-p11			p11	<u>53.2</u>	
			HIV-nef	3.9	
			none	2.8	
1-p3	HSC-4 transfected with KM-HN-1 ^B	A24/31,B7/51,C7/14	none	<u>32.9</u>	
1-p7			none	<u>26.5</u>	
1-p9			none	3.6	
1-p11			none	2.7	
1-p12			none	1.2	
2-p11			none	1.6	
1-p3	HSC-4	A24/31,B7/51,C7/14	none	10.4	
1-p7			none	2.7	
1-p9			none	2.7	
1-p11			none	3.5	
1-p12			none	1.6	
2-p11			none	1.3	

^A細胞傷害活性は 4 時間の ⁵¹Cr release assay にて検討した。

^BHLA-A24 を発現する KM-HN-1 陰性の頭頸部癌細胞株 HSC-4 に KM-HN-1 遺伝子を導入した細胞

図 1 3

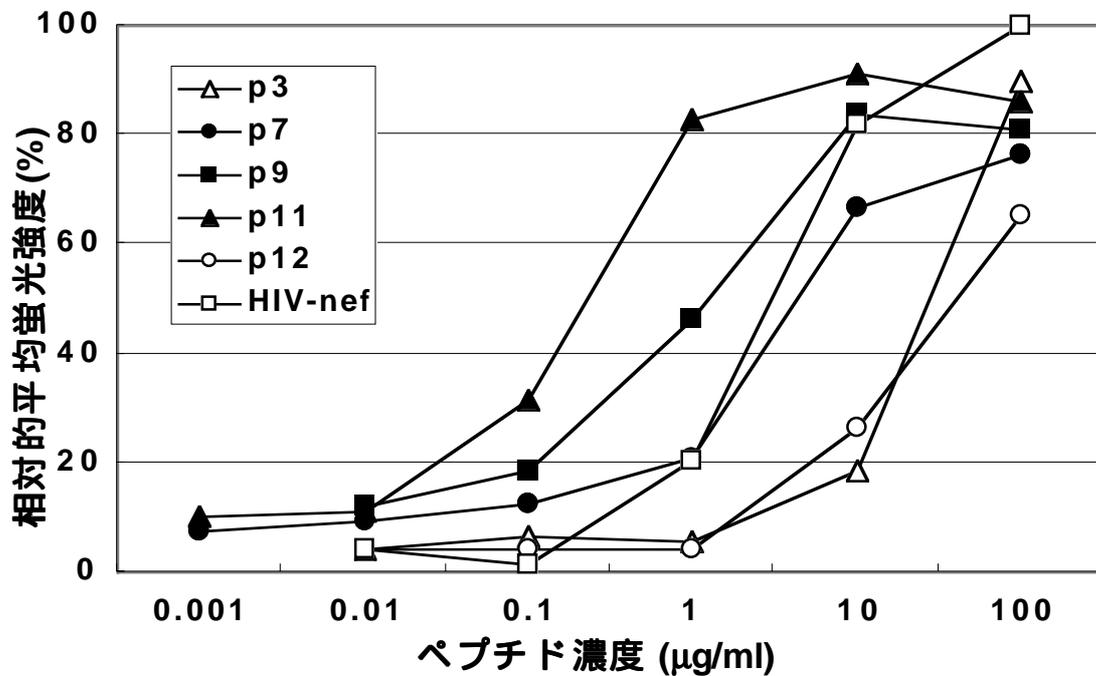


図 1 3 RMA-S-A*2402 細胞を用いた HLA-ペプチド結合試験

CTL 株が誘導できた 5 種類の KM-HN-1 由来ペプチドと陽性対照として HIV-nef ペプチドを用いた結合試験。26 で 16 時間培養した RMA-S-A*2402 細胞に様々な濃度のペプチドを加えて、さらに 3 時間培養した。その後 37 で 3 時間培養した後に、W6/32 抗体を用いて HLA クラス II を染色し FACScan にて蛍光強度を測定した。26 の状態のままの細胞の蛍光強度を 100%、ペプチドを加えずに 37 にした後の細胞を 0% として相対値を計算した。

図 1 4

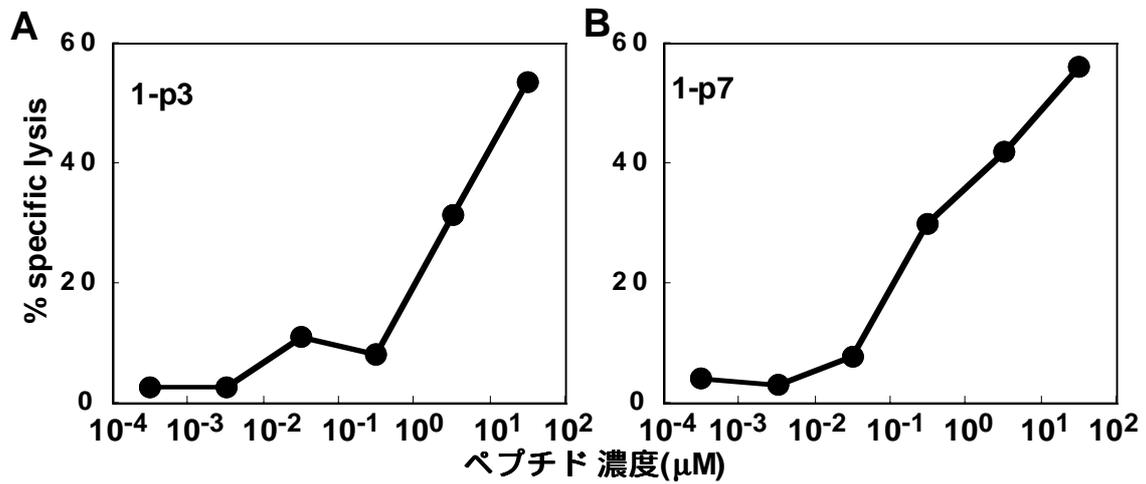


図 1 4 C1R-A*2402 細胞を標的とした細胞傷害活性

健康人の PBMC から誘導した CTL 株を用いた ⁵¹Cr release assay。A は p3、B は p7 を用いて誘導した CTL 株をエフェクター細胞とした。エフェクター/ターゲット比は 10/1。様々な濃度のペプチドを加えて細胞傷害活性を測定したところ、濃度依存性に細胞傷害活性が増加した。

図 1 5

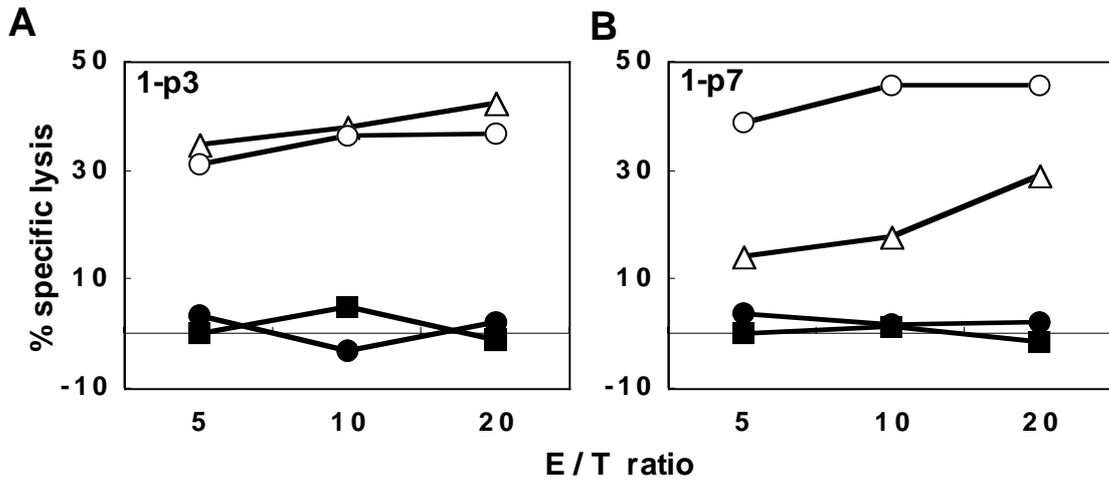


図 1 5 KM-HN-1 特異的 CTL 株による癌細胞株に対する細胞傷害活性

○: 肺癌細胞株 PC-9(HLA-A24 陽性、KM-HN-1 陽性)、△: 食道癌細胞株 TE-3(HLA-A24 陽性、KM-HN-1 陽性)、●: 食道癌細胞株 TE-9(HLA-A24 陰性、KM-HN-1 陽性)、■: 食道癌細胞株 TE-10(HLA-A24 陽性、KM-HN-1 陰性)を標的細胞とした。A は p3、B は p7 のペプチドで誘導した CTL 株をエフェクター細胞としたものであり、これらは KM-HN-1 と HLA-A24 を両方発現する細胞だけを傷害した。

図 16

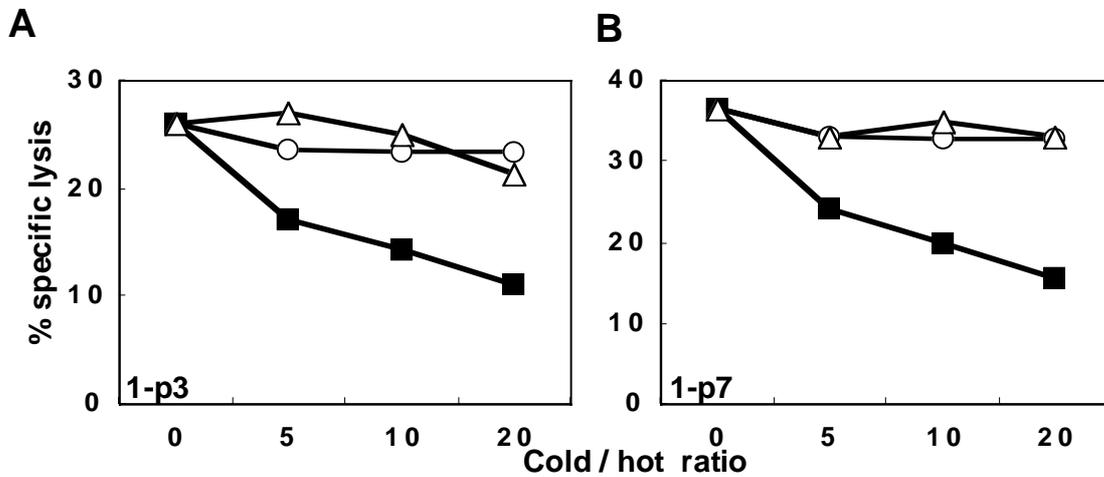


図 16 非標識標的細胞を用いた細胞傷害阻害試験

非標識標的細胞として C1R-A*2402 細胞、標識細胞として PC-9 を使用した cold target inhibition assay。○: C1R-A*2402 細胞のみ、△: C1R-A*2402 細胞に HIV-nef ペプチドを 10 μM 加えたもの、■ C1R-A*2402 細胞に CTL の誘導に使用したペプチドを 10 μM 加えたものを非標識標的細胞として、標識細胞の 5 倍、10 倍、20 倍加えて ⁵¹Cr release assay を行ったところ KM-HN-1 由来ペプチドを加えたときのみ阻害された。A は p3、B は p7 のペプチドで誘導した CTL 株をエフェクター細胞とした。

8 考察

本研究では頭頸部癌を対象として SEREX 解析を行い、19 種類の腫瘍関連抗原を同定した。そのうち 2 つの抗原 KM-HN-1 と KM-HN-3 は CT 抗原と同じ発現パターンを示すものであった。

今回同定した抗原で機能などが分かってない抗原、7 種類中 4 種類は PSORT ウェブサイトでの検索で核蛋白であることが予想され、また機能などが分かっている抗原、12 種類中 6 種類は核蛋白であった。同定した抗原のうち半数以上が核蛋白であった理由はアポトーシスやネクローシスに陥った癌細胞が、過剰の核蛋白を放出させた結果、液性免疫応答が惹起されたからではないかと考えた。

またいくつかの抗原は、既に癌で発現が上昇すると報告されたものであった。MAGE-A4 (KM-HN-5) は食道癌、頭頸部癌、肺癌、膀胱癌、転移性悪性黒色腫、ホジキンリンパ腫で発現し、CTL に認識される CT 抗原として報告され、現在、転移性悪性黒色腫患者を対象に臨床試験が進められている (42)。我々の研究で、他にも甲状腺癌、膵癌でも発現していることが分かった。インテグリン 6 (KM-HN-12) は癌の進行と関連がある蛋白として同定されたものである (43)。リボソーマルプロテイン L35a (KM-HN-14) は高分化型神経膠腫で発現が上がるという報告があるのに加え、リボソーマルプロテインの 80 種類以上は様々な癌で発現が増加するという報告もある (44)。UBE3A (KM-HN-19) は p53 とヒトパピローマウイルス E6 の会合に必要な蛋白ということで同定されたものであるが、後の研究でユビキチン-プロテインリガーゼのひとつであることが分かっている (45)。

このように今回同定した抗原には様々なものが含まれていたが、当初の目的である新たな CT 抗原も 2 種類同定できた。そこでそのうちのひとつの KM-HN-1 について免疫学的な解析を進めた。

KM-HN-1 はロイシンジッパーモチーフ、コイルドコイルドメインと小胞体膜ドメインを含み、またセントロメアープロテイン F (CENP-F) と 20% 以下ではあるが有意な相同性をもっていた。CENP-F は G2 期から M 期の後期までキネトコアと会合し紡錘体の間に存在し、その後すみやかに分解される。この局在から染色体の分裂におけるなんらかの役割を果たしているのではないかと

と考えている (46, 47)。また CENP-F に対する自己抗体の上昇が癌患者や GVHD 患者で認められている (48)。我々の研究でも KM-HN-1 は M 期において染色体と同じところに局在することが分り、また様々な癌患者において抗体価の上昇がみられることから同じような機能をもっていることが示唆された。

KM-HN-1 は様々な癌で発現しており、SEREX 法で同定された抗原であることから、様々な癌患者で抗体価の上昇がみられるのではないかと考え、ELISA 法をもちいて抗体価の測定を行ったところ、調べた全ての種類の癌患者において健常人と比べて有意な抗体価の上昇がみられた。そこで腫瘍マーカーとして使用できないかと考え治療前後や再発後の抗体価の変動を調べた。悪性黒色腫患者 10 例について検討したが、術後に抗体価が低下する例はなかった。しかし癌発見のためのスクリーニングに使用できる可能性はあり、また多くの癌患者の体内において KM-HN-1 に対する免疫応答が誘導されていることが分かった。

我々が同定しようと試みた腫瘍抗原は、腫瘍免疫療法のターゲットとしての抗原であり、先に述べたようにその第一の必要条件は CTL に認識される抗原であるということである。CTL に認識される腫瘍抗原は、現在までに数十種類発表されており、また CT 抗原であると発表された抗原も 20 種類程度あるが、CTL に認識されることが確認された CT 抗原は、いまだ数個に過ぎない。そこで KM-HN-1 について、HLA-A*2402 結合モチーフをもちいてペプチドを合成し CTL の誘導を試みた。HLA-A24 は日本人における HLA クラス II の最も高頻度 (約 60%) なアレルであり、中国人の 30%、白人の 20%を占めるものであることからこれを選び解析した (49)。

健常人の PBMC を刺激し 13 種類中 5 種類 (p3、7、9、11、12) のペプチドで特異的な CTL 株が樹立できた。HLA-ペプチド結合試験の結果では結合力の強いことが CTL 株の樹立と完全に一致しないことが分かったが、残りの 8 種類のペプチドで誘導できなかった理由はわからなかった。さらなる解析で、5 種類の CTL 株のうち KM-HN-1 の遺伝子導入株や癌細胞株を傷害できたのは 2 種類 (p3、7) だけであった。その理由としては 3 種類のペプチド (p9、11、12) は少なくとも今回調べた細胞株中ではプロセッシングされないペプチドであったのだと考えられた。

元来、SEREX 法は癌患者の血清中の抗体を利用して癌抗原を同定しようという試みであるが、その研究成果として膜蛋白質のみでなく、細胞質や核内の

蛋白質、すなわち、あらゆる蛋白質に対して抗体が産生されることが示された。癌細胞が常に破壊され、細胞内の蛋白が免疫系に暴露され、免疫応答を惹起している可能性が考えられる。また上記のように 20 種類程度の CT 抗原が同定されているが、その蛋白としての機能はほとんど分かっていない。今回 KM-HN-1 は DNA 結合蛋白である可能性が示されたが、その発現パターンより癌遺伝子や癌抑制遺伝子である可能性も考えられる。これらが今後の重要な検討課題として残された。

以上の結果は、本研究で同定した腫瘍抗原が将来的に癌の診断や治療において有用となる可能性を示すものである。

9 おわりに

頭頸部癌を対象に正常精巢 cDNA 発現ライブラリーを使った SEREX 法を用いて、19 種類の腫瘍関連抗原を同定した。またそのうちのひとつ KM-HN-1 は、新規 CT 抗原であることが分り、その抗原性を解析した。KM-HN-1 は多くの癌患者の *in vivo* において液性免疫応答を起こしていることが分り、また *in vitro* において腫瘍細胞を傷害できる CTL を誘導できることも示された。この蛋白の機能については今後の検討を要するが、腫瘍免疫療法の標的分子になり得る可能性と特異的抗体価の測定が癌の診断に使用できる可能性が示された。今後 *in vivo* におけるワクチンとしての有用性などを検討し、また当教室で進めている樹上細胞療法と組み合わせ、腫瘍免疫療法の一翼を担えればと期待している。

1 0 参考文献

1. Germain, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 76: 287-299, 1994.
2. Berke, G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol*, 12: 735-773, 1994.
3. Lanier, L. L. and Phillips, J. H. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today*, 17: 86-91, 1996.
4. York, I. A. and Rock, K. L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*, 14: 369-396, 1996.
5. Heemels, M. T. and Ploegh, H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem*, 64: 463-491, 1995.
6. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329: 512-518, 1987.
7. Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R., and Wiley, D. C. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*, 353: 326-329, 1991.
8. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290-296, 1991.
9. Engelhard, V. H. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, 12: 181-207, 1994.
10. Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41: 178-228, 1995.
11. Saper, M. A., Bjorkman, P. J., and Wiley, D. C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol*, 219: 277-319, 1991.
12. Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Chi, Y. I., Stauffer, C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Three-dimensional structure

- of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, 368: 711-718, 1994.
13. Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368: 215-221, 1994.
 14. Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science*, 264: 961-965, 1994.
 15. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647, 1991.
 16. Van den Eynde, B. J. and van der Bruggen, P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, 9: 684-693, 1997.
 17. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., and Rosenberg, S. A. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 3515-3519, 1994.
 18. Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res*, 16: 313-339, 1997.
 19. Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Slingluff, C. L., Jr. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, 264: 716-719, 1994.
 20. Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamana, H., and Itoh, K. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 187: 277-288, 1998.
 21. Wang, R. F., Wang, X., Atwood, A. C., Topalian, S. L., and Rosenberg, S. A. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science*, 284: 1351-1354, 1999.

22. Pieper, R., Christian, R. E., Gonzales, M. I., Nishimura, M. I., Gupta, G., Settlege, R. E., Shabanowitz, J., Rosenberg, S. A., Hunt, D. F., and Topalian, S. L. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 189: 757-766, 1999.
23. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med*, 4: 321-327, 1998.
24. Jager, E., Jager, D., and Knuth, A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev*, 18: 143-150, 1999.
25. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P., and Boon, T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*, 80: 219-230, 1999.
26. Nestle, F. O., Aljagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 4: 328-332, 1998.
27. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 11810-11813, 1995.
28. Old, L. J. Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res*, 41: 361-375, 1981.
29. Utsumi, K. R., Yoshida, T. O., Sekikawa, M., and Klein, G. Antibodies to cell organoids in the sera of nasopharyngeal carcinoma patients and of systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Immunol*, 2: 159-171, 1973.

30. Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*: 1914-1918, 1997.
31. Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L. J., and Knuth, A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*, *187*: 265-270, 1998.
32. Sahin, U., Tureci, O., and Pfreundschuh, M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, *9*: 709-716, 1997.
33. Tureci, O., Sahin, U., and Pfreundschuh, M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today*, *3*: 342-349, 1997.
34. Nakatsura, T., Senju, S., Ito, M., Nishimura, Y., and Itoh, K. Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol*, *32*: 826-836, 2002.
35. Nakatsura, T., Senju, S., Yamada, K., Jotsuka, T., Ogawa, M., and Nishimura, Y. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, *281*: 936-944, 2001.
36. Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, *12*: 337-365, 1994.
37. Huang, L. Q., Brasseur, F., Serrano, A., De Plaen, E., van der Bruggen, P., Boon, T., and Van Pel, A. Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma. *J Immunol*, *162*: 6849-6854, 1999.
38. Tureci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Scmitt, H., Schild, H. J., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H. G., and Pfreundschuh, M. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res*, *56*: 4766-4772, 1996.
39. Tureci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., and Pfreundschuh, M.

- Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 5211-5216, 1998.
40. Chen, Y. T., Gure, A. O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A., and Old, L. J. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 6919-6923, 1998.
 41. Ibe, M., Moore, Y. I., Miwa, K., Kaneko, Y., Yokota, S., and Takiguchi, M. Role of strong anchor residues in the effective binding of 10-mer and 11-mer peptides to HLA-A*2402 molecules. *Immunogenetics*, 44: 233-241, 1996.
 42. Hillig, R. C., Coulie, P. G., Stroobant, V., Saenger, W., Ziegler, A., and Hulsmeijer, M. High-resolution structure of HLA-A*0201 in complex with a tumour-specific antigenic peptide encoded by the MAGE-A4 gene. *J Mol Biol*, 310: 1167-1176, 2001.
 43. Van Waes, C., Kozarsky, K. F., Warren, A. B., Kidd, L., Paugh, D., Liebert, M., and Carey, T. E. The A9 antigen associated with aggressive human squamous carcinoma is structurally and functionally similar to the newly defined integrin alpha 6 beta 4. *Cancer Res*, 51: 2395-2402, 1991.
 44. Kroes, R. A., Jastrow, A., McLone, M. G., Yamamoto, H., Colley, P., Kersey, D. S., Yong, V. W., Mkrdichian, E., Cerullo, L., Leestma, J., and Moskal, J. R. The identification of novel therapeutic targets for the treatment of malignant brain tumors. *Cancer Lett*, 156: 191-198, 2000.
 45. Eichmuller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D., and Schadendorf, D. Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 629-634, 2001.
 46. Liao, H., Winkfein, R. J., Mack, G., Rattner, J. B., and Yen, T. J. CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol*, 130: 507-518, 1995.
 47. Hussein, D. and Taylor, S. S. Farnesylation of Cenp-F is required for G2/M progression and degradation after mitosis. *J Cell Sci*, 115: 3403-3414, 2002.
 48. Rattner, J. B., Rees, J., Whitehead, C. M., Casiano, C. A., Tan, E. M., Humbel, R. L., Conrad, K., and Fritzler, M. J. High frequency of neoplasia in patients with autoantibodies to centromere protein CENP-F. *Clin Invest Med*, 20: 308-319,

1997.

49. Imanishi, T., Akazawa, T., Kimura, A., Tokunaga, K., and Gojobori, T. 1992. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In *HLA 1991, Vol. 1*. K. Tsuji, M. Aizawa, and T. Sasazuki, editors. Oxford Scientific Publications, Oxford. 1065-1220.